

---

# THESE

Présentée à

L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

par

**Vincent COLOMBIÉ**

Ingénieur École des Mines de Paris

en vue de l'obtention du

**DOCTORAT**

n° d'ordre : 807

Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Filière : Microbiologie et Biocatalyse industrielles

Description de la production de spiramycine par  
*Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique,  
simulation et capteur logiciel.

Soutenue le 16 décembre 2005 devant la commission d'examen :

Mr J.P. STEYER	Directeur de recherche, I.N.R.A. Narbonne	Rapporteur
Mr. J.L. GOERGEN	Professeur, E.N.S.A.I.A. Nancy	Rapporteur
<u>Mr. G. ROUX</u>	Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse	Examineur
Mme C. BIDEAUX	Ingénieur de recherche, C.N.R.S.	Examineur
Mr D. HALLET	Ingénieur R&D, P.D.B. Sanofi-Aventis	Examineur
Mr. J.L. URIBELARREA	Professeur, INSA, Toulouse	Directeur de thèse

Cette thèse a été préparée au Laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés UMR-CNRS 5504, UR-INRA 792 du Département de Génie Biochimique et Alimentaire de l'INSA de Toulouse

---

**NOM : COLOMBIÉ**

**Prénom : Vincent**

**Titre : Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*.**

**Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel.**

Thèse de Doctorat, spécialité : Microbiologie & Biocatalyse industrielles, I.N.S.A. Toulouse  
2005, N° d'ordre : 807, 174 pages

---

**Résumé :** L'objectif de cette étude est le développement d'un outil mathématique permettant de décrire la dynamique de croissance et de production de métabolites secondaires par un microorganisme. La résolution formelle d'un réseau métabolique regroupant les voies des métabolismes central et secondaire a conduit à une structure permettant de décrire la croissance par la seule connaissance de mesures accessibles en ligne ; toutefois, il est impossible de prédire la production d'antibiotique uniquement à l'aide des flux d'échange de matière et la modélisation stoechiométrique doit être complétée par une modélisation phénoménologique dont la structure est à définir par une approche expérimentale. Dans le cadre de ses limites métaboliques d'application définies lors de cette dernière, le modèle a été enrichi pour permettre la description de l'accumulation de macromolécules constitutives et implémenté par un modèle phénoménologique simple permettant de décrire la cinétique de production de spiramycine. En substituant les variables d'entrée symboliques soit par des contraintes métaboliques soit par des mesures en ligne, un simulateur de la production et un capteur logiciel apte à évaluer en ligne les différentes phases de croissance et de production sont respectivement obtenus.

---

**Mots-clés :** modélisation métabolique – stoechiométrie – phénoménologie – cinétique – culture "fed-batch" – spiramycine – *Streptomyces ambofaciens*

---

**Jury :**

Président :	G. ROUX	Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse
Rapporteurs :	J.-P. STEYER	Directeur de Recherche, I.N.R.A. Narbonne
	J.-L. GOERGEN	Professeur, E.N.S.A.I.A. Nancy
Examineurs :	C. BIDEAUX	Ingénieur de Recherche, C.N.R.S.
	D. HALLET	Ingénieur R&D, P.D.B. Sanofi- Aventis
	<u>J.L.URIBELARREA</u>	Professeur, I.N.S.A. Toulouse

Soutenue le 16 décembre 2005 au laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés, UMR CNRS 5504 – INRA 792, I.N.S.A. Toulouse

**Title:** Description of spiramycin production by *Streptomyces ambofaciens*. Metabolic modeling, simulation and software sensor.

**Summary:** The aim of this study is the development of a mathematical model which can describe a microorganism growth dynamic as well as its secondary metabolites productions. Eventually, this model might :

- identify and quantify the various steps of the fermentation (growth, macromolecular change, production) from on-line measurements during the process

- help to understand the behavior of overproducing strains by means of simulation

The analysis of a metabolic network which includes the central and secondary metabolism pathways led to a structure able to describe the growth dynamic with on-line measurements only. However it appeared impossible to predict the antibiotic production using the latter so the stoichiometric model has to be coupled to a phenomenological model the structure of which has to be defined experimentally

The experimental study involved :

- the design of a chemically defined culture medium

- the characterization of kinetic parameters during various nutrient limitations (nitrogen, carbon)

- the study of the effect of minimal glycolytic flux and anabolic activity on the antibiotic production

- the identification of intracellular reserves formation and a correlation between their catabolism and the production

In the range of its metabolic limits defined experimentally, the model was developed to describe the formation of intracellular polymers and coupled to a simple phenomenological model to describe the spiramycin production kinetic. Replacing symbolic input variables either by metabolic constraints or by on-line measurements, a simulator of the production and a software sensor able to determine the various phases of the culture on-line are respectively built.

“ The true delight is in the finding out rather than in the  
knowing “

Isaac Asimov

# REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu Carine Bideaux pour sa contribution scientifique et technique sans laquelle il n'aurait pas été possible d'atteindre les objectifs de cette thèse de manière satisfaisante, ainsi que pour ses qualités humaines si précieuses dans les moments difficiles inhérents à tout travail de recherche.

Je remercie la société Sanofi-Aventis pour son soutien financier, en particulier François Voelker et Régis Gervier pour leur éclairage scientifique et technique de même que pour la qualité du suivi de ce projet. Je remercie particulièrement Damien Hallet pour sa participation au jury de thèse.

Je remercie par ailleurs les professeurs Monsan et Goma de m'avoir accordé leur confiance lorsque je me suis lancé dans ce troisième cycle, ainsi que le professeur Uribe Larrea d'avoir accepté de diriger ce travail et toute l'équipe de Génie Microbiologique pour sa contribution. Je suis sensible à l'honneur que m'ont Jean-Philippe Steyer et Jean-Louis Goergen en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse ; je tiens à remercier Carine Bideaux et Jean-Louis Uribe Larrea d'avoir participé au jury de thèse ainsi que Gilles Roux d'avoir accepté de le présider.

Je n'oublie pas l'ensemble des personnes que j'ai croisées au L.B.B. qui en ont fait un lieu peu banal à mes yeux, en particulier Seb pour les discussions sans fin au cours desquelles on a entre autre refait le monde bien meilleur qu'il n'est !

Je remercie également toute ma famille pour son soutien et son affection sans retenue au cours de mes longues études... Je citerai en particulier ma mère, mon frère Damien avec Isabelle et leur adorable petit Romain, ainsi que Djé, mon frère niçois. Enfin, merci Nico et Steph de m'avoir accueilli sur Toulouse. Ces quatre années passées ici ont été pour moi les plus enrichissantes, à tous points de vue, et je vous le dois en grande partie ; ça ne pourra s'effacer !

## SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	page 1
Chapitre I Etude bibliographique	page 3
I.A. Modélisation	page 3
I.A.1. Généralités sur l'Analyse des Flux Métaboliques	page 3
I.A.2. Principe de modélisation	page 4
I.A.3. Modèles dynamiques	page 11
I.A.4. Limitations de MFA	page 11
I.A.5. Applications de MFA à l'étude des <i>Streptomyces</i>	page 12
I.A.5.a. Modèles MFA	page 13
I.A.5.a.1. Modèles métaboliques mis en œuvre	page 13
I.A.5.a.2. Méthodes de résolution	page 14
I.A.5.a.3. Résultats	page 16
I.A.5.b. Modèles hybrides	page 19
I.A.5.b.1. Généralités	page 19
I.A.5.b.2. Exemples d'application	page 21
I.A.5.b.2.i. Modélisation hybride d'une culture batch	page 21
I.A.5.b.2.ii. Modélisation hybride d'une culture fed-batch	page 22
I.B. Les <i>Streptomyces</i>	page 23
I.B.1. Généralités	page 23
I.B.2. <i>Streptomyces ambofaciens</i>	page 25
I.B.3. Produits de fermentation	page 26
I.B.4. Réserves intracellulaires	page 27
I.C. Le métabolisme secondaire	page 29
I.C.1. Généralités	page 29
I.C.1.a. Définition et hypothèses sur son origine	page 29
I.C.1.b. Occurrence en fermentation	page 31
I.C.2. La spiramycine	page 33
I.C.2.a. Structure et voie de biosynthèse	page 33
I.C.2.b. Régulation de la production	page 36
I.C.2.b.1. Sources carbonées	page 36
I.C.2.b.2. Sources azotées et phosphate	page 37
I.C.2.b.3. Acides gras à courtes et longues chaînes	page 38
I.C.2.b.4. Rôle des oligo-éléments	page 39
I.C.2.b.5. Rôle de la morphologie	page 40

Chapitre II Matériel & méthodes	page 41
II.A. Souche et milieux de culture	page 41
II.A.1. Souche	page 41
II.A.2. Milieux de culture	page 41
II.B. Conditions de culture	page 44
II.B.1. Pré-cultures	page 44
II.B.2. Cultures en fermenteur de 20 litres	page 44
II.C. Définition des conduites Fed-batch	page 47
II.D. Techniques analytiques	page 49
II.D.1. Biomasse	page 49
II.D.2. Glucose	page 49
II.D.2.a. YSI	page 49
II.D.2.b. D.N.S.	page 50
II.D.3. Ammonium	page 50
II.D.4. Phosphate	page 51
II.D.5. Acides organiques volatils	page 51
II.D.6. Acides organiques non volatils	page 52
II.D.7. Spiramycines	page 52
II.D.8. Gaz de fermentation	page 53
II.D.8.a. Détermination des fractions molaires	page 53
II.D.8.b. Calcul des vitesses de production de $\text{CO}_2$ et de consommation d' $\text{O}_2$	page 53
II.D.8.c. Correction des données gaz	page 54
II.D.8.d. Calcul du coefficient de transfert d'oxygène $k_L a$	page 54
II.D.9. Traitement des données expérimentales	page 55
II.D.9.a. Lissage et réconciliation des données	page 55
II.D.9.b. Interpolation des points expérimentaux	page 56
II.D.9.c. Bilans carbone et redox	page 56
II.D.10. Analyse des flux métaboliques	page 57
II.D.10.a. Généralités sur le type de modèle utilisé	page 57
II.D.10.b. Formulation et écriture mathématique	page 57
II.D.10.c. Hypothèses simplificatrices	page 59
II.D.10.d. Généralisation	page 60
II.D.10.e. Résolution du système d'équations de flux	page 61

Chapitre III Construction du modèle	page 64
III.A. Réseau métabolique	page 64
III.A.1. Métabolisme central	page 64
III.A.1.a. La glycolyse	page 64
III.A.1.b. Le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) et la voie anaplérotique	page 64
III.A.1.c. La voie des pentoses -phosphate (ou voie PPP)	page 65
III.A.1.d. La synthèse des acides aminés	page 65
III.A.1.d.1. Acides aminés aromatiques	page 65
III.A.1.d.2. Acides aminés à chaînes ramifiées	page 66
III.A.1.d.3. Autres acides aminés	page 66
III.A.1.e. La synthèse des nucléotides	page 67
III.A.1.e.1. Ribonucléotides	page 67
III.A.1.e.2. Déoxyribonucléotides	page 67
III.A.1.f. La synthèse du tréhalose et des précurseurs des polysaccharides	page 68
III.A.1.g. La synthèse des acides gras et de l'acétate	page 68
III.A.1.h. La phosphorylation oxydative	page 69
III.A.1.i. Les réactions de transport	page 69
III.A.1.j. La synthèse des macromolécules constitutives de la biomasse	page 69
III.A.1.j.1. Protéines, ADN, ARN et lipides	page 71
III.A.1.j.2. Polysaccharides	page 71
III.A.1.k. La synthèse de la biomasse	page 73
III.A.2. Métabolisme secondaire	page 73
III.A.2.a. Voies de synthèse des précurseurs de l'aglycone (ou platénolide)	page 73
III.A.2.a.1. MalonylCoA	page 73
III.A.2.a.2. Méthyl-malonylCoA	page 73
III.A.2.a.3. Ethyl-malonylCoA	page 74
III.A.2.a.4. Métoxy -malonylCoA	page 74
III.A.2.b. Synthèse des sucres	page 74
III.A.2.c. Synthèse du platénolide	page 74
III.A.2.d. Greffage des sucres, modifications terminales et transport de la spiramycine	page 74
III.B. Résolution du système d'équations de flux	page 75
III.B.1. Logiciel de calcul symbolique des flux métaboliques	page 75
III.B.2. Résolution des systèmes d'équations de flux utilisés	page 76
III.B.2.a. Modèle décrivant le métabolisme de <i>S.ambofaciens</i> en croissance non limitée sur milieu salin	page 77



III.B.2.b. Modèle décrivant le métabolisme de <i>S.ambofaciens</i> en croissance limitée par le carbone sur milieu salin	page 77
III.B.2.c. Modèle décrivant le métabolisme secondaire de <i>S.ambofaciens</i> en culture limitée par le carbone sur milieu salin	page 78
III.B.2.d. Modélisation des cultures pendant lesquelles plusieurs productions d'acides organiques ont lieu	page 78
III.C. Valeurs nominales des paramètres symboliques du modèle	page 79
III.C.1. Paramètres de composition de la biomasse	page 79
III.C.1.a. Composition macromoléculaire	page 79
III.C.1.b. Composition des macromolécules	page 80
III.C.1.b.1. Acides nucléiques	page 80
III.C.1.b.2. Protéines	page 81
III.C.1.b.3. Polysaccharides	page 82
III.C.1.b.4. Lipides	page 83
III.C.2. Paramètres énergétiques	page 85
III.D. Analyse de la sensibilité des flux à la variation des paramètres du modèle	page 89
III.D.1. Principe	page 89
III.D.2. Résultats	page 89
III.E. Stratégies de modélisation	page 92
III.E.1. Problématique	page 92
III.E.2. Simplification du modèle métabolique	page 92

## Chapitre IV Etude expérimentale page 95

IV.A. Cultures Batch	page 95
IV.A.1. Définition et validation du milieu de culture	page 95
IV.A.1.a. Définition du milieu de culture	page 95
IV.A.1.b. Résultats	page 96
IV.A.1.c. Bilans matière	page 100
IV.A.2. Vérification des bilans matière sur l'ensemble de la fermentation et détermination du paramètre $\frac{P}{O}$	page 103
IV.A.2.a. Objectis	page 103
IV.A.2.b. Résultats	page 104
IV.A.2.c. Bilans matière	page 106
IV.A.2.d. Détermination du paramètre $\frac{P}{O}$	page 107

IV.A.3. Etude de la corrélation entre la consommation des acides gras volatils et la production de spiramycine	page 108
IV.A.3.a. Objectifs	page 108
IV.A.3.b. Résultats	page 109
IV.B. Cultures Fed-batch	page 112
IV.B.1. Nécessité d'intégrer une source de carbone exogène au modèle ?	page 112
IV.B.2. Impact de la source de carbone exogène dans le modèle	page 114
IV.B.2.a. Définition des cultures Fed-batch	page 114
IV.B.2.b. Résultats	page 115
IV.B.2.b.1. Culture Fed-batch n°1	page 115
IV.B.2.b.2. Culture Fed-batch n°2	page 118
IV.B.2.b.3. Culture Fed-batch n°3	page 119
IV.B.2.c. Conclusion	page 120
IV.B.3. Etude de l'apport de lipides exogènes pendant la phase stationnaire	page 121
IV.B.4. Place des sources de carbone endogène dans le modèle	page 122
IV.B.4.a. Résultats	page 122
IV.C. Conclusion	page 123

## Chapitre V Structure et validation du modèle hybride à travers son utilisation comme capteur logiciel ou comme simulateur

V.A. Structure du modèle	page 127
V.A.1. Description de la biomasse	page 127
V.A.1.a. Description de la croissance de <i>S. ambofaciens</i> pendant la phase exponentielle	page 128
V.A.1.b. Description de l'accumulation de matière sèche suite au stress nutritionnel sur l'azote	page 128
V.A.2. Production de spiramycine	page 129
V.B. Modélisation et simulation des cultures carencées en azote et limitées en glucose	page 131
V.B.1. Utilisation du modèle construit en tant que capteur logiciel	page 131
V.B.2. Utilisation du modèle construit en tant que simulateur	page 133
V.C. Validation de la robustesse du modèle hybride construit	page 135
V.C.1. Définition de la culture de validation	page 135
V.C.2. Résultats	page 137
V.D. Conclusion	page 140

**CONCLUSION GENERALE** ..... page 142

**Références bibliographiques** ..... page 148

**Table des illustrations** ..... page 156

**Annexe n°1** ..... page 160

**Annexe n°2** ..... page 163

## **INTRODUCTION GENERALE**

Le marché mondial des antibiotiques est passé de vingt cinq milliards de dollars en 1994 à trente et un milliards de dollars en 2003 et, durant cette période, l'augmentation la plus significative des ventes a concerné les fluoroquinolones et les macrolides tandis que la part des anti-infectieux dans le marché pharmaceutique global a diminué de 1,5% [IMS Life Cycle R&D Focus, IMS Health Inc. (2004)].

La spiramycine est un antibiotique produit par *Streptomyces ambofaciens* après induction d'un métabolisme secondaire complexe. La biosynthèse de cet antibiotique de la famille des macrolides est une production bactérienne très minoritaire, la quantité d'antibiotique produit représentant globalement moins de 1% du carbone consommé lors de la culture du microorganisme producteur. Ce produit d'intérêt pharmaceutique est synthétisé lorsque la croissance de la bactérie est stoppée ou significativement ralentie du fait d'un stress environnemental, généralement suite à une carence ou une limitation nutritionnelle. Ainsi, les opérations de production industrielle ont des durées importantes atteignant plusieurs jours. Elles sont d'une manière générale compliquées par un phénomène de non reproductibilité en fonction des conditions initiales (environnement physico-chimique, qualité des matières premières, contaminations éventuelles...), pouvant conduire dans des cas extrêmes à une absence totale de production.

La compétition avec les pays émergents s'accroissant dans le domaine de la production industrielle d'anti-infectieux, il apparaît intéressant de progresser dans la capacité d'assurer de manière stable et reproductible un titre optimal et une productivité maximale à moindre coût. Dans ce cadre, il semble entre autre judicieux d'identifier des phénomènes-clés liés à la phase de production d'antibiotique, de pouvoir évaluer l'avancement de la réaction et quantifier la production de spiramycine en ligne.

Dans tous les procédés microbiologiques, la biomasse est le catalyseur par lequel les substrats sont convertis en produits d'intérêt. Il est nécessaire de maîtriser en temps réel l'évolution des paramètres physico-chimiques du milieu réactionnel, qui sont en interaction avec le comportement métabolique du microorganisme producteur, afin de conserver les conditions optimales de production. Lors des cultures de microorganismes filamenteux, la morphologie particulière de ces derniers limite la description de la biomasse à sa masse sèche voire à la mesure de son PCV (Packed Cell Volume).

Dès lors, la question qui se pose est de savoir si la modélisation a la capacité de décrire plus précisément la biomasse, qualitativement et quantitativement, et d'identifier des conditions opératoires optimales par une approche plus cognitive et plus déductive. Le but de ce travail est de répondre à ces questions ; à cette fin, une technique de modélisation transposable à différents microorganismes et extrapolable à des conditions opératoires significativement différentes de celles ayant permis de la construire a été mise en œuvre : l'analyse des flux métaboliques. Tenant pour acquis un modèle de ce type validé pour la levure, les travaux devraient être axés sur l'élaboration d'un modèle similaire pour la description métabolique de *Streptomyces ambofaciens*, producteur de spiramycine, et sur son évolution pour qu'il soit pertinent dans le cadre d'une production de métabolite secondaire i.e. qu'il puisse décrire une transition métabolique causée par un stress environnemental. Comme dans toute démarche de modélisation, suite à la construction d'un tel modèle, il sera nécessaire de le valider en l'appliquant au suivi en ligne d'une production de spiramycine (fonction capteur logiciel) et à la prédiction de la dynamique de croissance et de production dans le cadre de conditions expérimentales significativement différentes à celles dans lesquelles il a été développé (fonction simulateur).

Le manuscrit est organisé suivant la chronologie de développement de ce travail de recherche. Dans un premier temps, une étude bibliographique présente la théorie de l'analyse des flux métaboliques et permet de vérifier la pertinence de son utilisation dans le cadre de ce travail. Les applications de cette technique de modélisation à d'autres *Streptomyces* producteur d'antibiotiques sont présentées et critiquées. La deuxième partie de l'étude bibliographique présente les grandes lignes de la physiologie du microorganisme producteur et les caractéristiques de la biosynthèse de spiramycine.

Dans un deuxième temps, la construction de la structure du modèle et son paramétrage sont décrits. Une étude expérimentale s'avère nécessaire dans un troisième temps pour achever le paramétrage, déterminer la structure finale du modèle la plus pertinente pour l'application considérée et définir quelles contraintes le procédé de culture doit respecter pour rentrer dans le cadre de cette modélisation. Dans un dernier temps, la validité du modèle ainsi construit est évaluée à travers son utilisation comme capteur logiciel puis comme simulateur.

## Chapitre I Etude bibliographique

### I.A. Modélisation

#### I.A.1. Généralités sur l'Analyse des Flux Métaboliques

Les contraintes imposées par la stoechiométrie sur la distribution des ressources dans le métabolisme sont un des aspects des nombreux mécanismes du contrôle cellulaire et de sa régulation [Varma et Palsson (1994)]. En effet, la fonction du catabolisme est de fournir l'ATP, un pouvoir réducteur et des précurseurs pour la biosynthèse [Noorman (1991)]. C'est pourquoi une bonne compréhension de la stoechiométrie est cruciale pour mieux comprendre les mécanismes qui régulent la cellule [Varma et Palsson (1994)].

Les biologistes désirent depuis longtemps pouvoir décrire quantitativement les flux dans les voies métaboliques [Savinell et Palsson (1992)]. Le flux détermine de manière fondamentale la physiologie de la cellule et est le paramètre le plus critique d'une voie métabolique, c'est une mesure du degré d'engagement des différentes voies dans les fonctions cellulaires globales [Stephanopoulos et *al.* (1998)]. Cependant, la complexité du schéma métabolique ainsi que le nombre élevé de paramètres cinétiques décrivant les catalyses enzymatiques intracellulaires rendent difficile la modélisation mathématique du métabolisme énergétique et massique des cellules [Varma et Palsson (1994)]. En effet, ces informations cinétiques ne sont pas disponibles pour toutes les enzymes d'une voie spécifique du métabolisme [Savinell et Palsson (1992)]. Comme la structure du métabolisme est mieux connue que les détails cinétiques de chaque enzyme [Varma et Palsson (1994)], un nouveau type de modèle métabolique basé sur le bilan des flux a été développé depuis les années 90 [Stephanopoulos et *al.* (1998)], il permet la détermination des flux *in vivo* et occupe une place centrale dans le génie métabolique [Stephanopoulos et *al.* (1998)] : l'analyse des flux métaboliques (MFA). Le concept de flux dans une voie, les méthodes de détermination des flux *in vivo* et les conclusions qui peuvent être tirées de l'étude systématique des flux métaboliques ont été regroupés sous le terme MFA [Stephanopoulos et *al.* (1998)].

La quantification des flux métaboliques est une technique d'analyse importante de l'ingénierie métabolique, particulièrement dans le cas des études de production de métabolites où le but est de diriger le plus de carbone possible du substrat vers le produit d'intérêt [Nielsen (1998)]. La quantification précise de l'intensité des flux dans les voies *in vivo* est également un but important de l'étude de la physiologie cellulaire [Stephanopoulos et *al.* (1998)].

Outre la quantification des différents flux métaboliques et la détermination des flux de carbones à l'intérieur de la cellule, MFA peut apporter des informations supplémentaires [Stephanopoulos et *al.* (1998)] :

- Evaluation de la flexibilité ou de la rigidité de points d'embranchement du réseau métabolique
- Identification des voies métaboliques qui sont compatibles avec les mesures macroscopiques ou élimination de voies non conformes à la conservation de la matière.
- Calcul de flux extracellulaires non mesurés quand le nombre de mesures est supérieur au nombre de vitesses à fixer pour calculer les flux intracellulaires. C'est cette capacité qui est exploitée dans le cadre de cette thèse.
- Calcul de rendements théoriques limites. Dans le cas de réseaux métaboliques complexes, l'approche formelle basée sur MFA est préférable pour le calcul de ces paramètres. Ce calcul permet d'avoir un point de référence pour les processus réels et peut aussi identifier des voies alternatives présentant un intérêt pour une application donnée.

#### I.A.2. Principe de modélisation

Cette approche est basée sur la loi fondamentale de conservation de la matière [Edwards et Palsson (1998)]. Elle est applicable sous certaines conditions de régime permanent et requiert uniquement des informations sur la stoechiométrie des voies métaboliques, la demande anabolique [Savinell et Palsson (1992)] et un nombre réduit de paramètres spécifiques à la souche [Edwards et Palsson (1998)]. Les modèles structurés qui en découlent permettent de décrire quantitativement la distribution des flux en régime stationnaire dans les voies métaboliques [Savinell et Palsson (1992)]. Une distribution de flux

contient des informations sur les contributions des différentes voies dans le métabolisme global, cependant la valeur réelle de ces distributions se trouve dans les différences observées quand des distributions de flux obtenues pour différentes souches ou différentes conditions environnementales sont comparées [Stephanopoulos et *al.* (1998)].

La demande anabolique est basée sur la composition de la biomasse [Savinell et Palsson (1992)]. Quatre groupes de macromolécules sont considérés comme représentatifs de la composition cellulaire : protéines, polysaccharides, lipides et acides nucléiques. Le modèle est alors construit avec les voies de biosynthèse menant à ces quatre polymères et les voies métaboliques nécessaires pour fournir l'énergie et les intermédiaires de biosynthèse [Varma et Palsson (1994)]. Si la quantité de polymères dans la biomasse est connue, la quantité de monomères peut être déduite et les flux de précurseurs indispensables à la croissance peuvent être calculés.

L'approche de modélisation structurée fait appel à cinq étapes [Vanrolleghem et Heijnen (1998)] :

1. Regroupement des connaissances *a priori* sur le métabolisme et construction des modèles
2. Choix *a priori* du modèle métabolique proposé
3. Estimation des paramètres inconnus du modèle
4. Validation du modèle construit

#### **Étape n°1 : Regroupement des connaissances *a priori* sur le métabolisme et construction des modèles**

Toutes les connaissances *a priori* disponibles sur la biochimie du système cellulaire étudié sont collectées dans une base de donnée de **m** composés considérés comme pertinents pour la description ainsi que **n** réactions biochimiques pertinentes entre ces composés. Parmi ces derniers, un nombre **p** est échangé à travers la membrane (substrats, produits) tandis que les **m-p** espèces chimiques restantes sont des intermédiaires intracellulaires (ATP, NADH...) [Vanrolleghem et Heijnen (1998)].

Les réactions à considérer sont le transport des **p** solutés à travers la membrane cellulaire, les réactions anaboliques (i.e. impliquées dans la biosynthèse) et les réactions cataboliques (i.e. impliquées dans le métabolisme énergétique) [Vanrolleghem et Heijnen (1998)]. Lorsque cela est possible, les réactions des voies linéaires sont regroupées en une réaction unique avec la stœchiométrie globale des réactions [Varma et Palsson (1994)]. Dans le cas où plusieurs voies complémentaires existent pour former un même métabolite, elles ont des fonctions similaires si elles sont actives simultanément. Ceci est le cas



pour la synthèse des précurseurs de nombreux métabolites secondaires. Leur prise en compte dans le modèle peut conduire à des problèmes d'observabilité quand MFA est mise en œuvre, autrement dit ces voies ne sont pas distinguables à l'aide des seules mesures extracellulaires [Stephanopoulos, Aristidou et Nielsen (1998)]. Ecrire la stœchiométrie des réactions est la tâche centrale de cette première étape [Vanrolleghem et Heijnen (1998)]

Ensuite ces informations sur le métabolisme sont mises sous forme matricielle, chaque colonne correspondant à une des réactions métaboliques répertoriées et chaque ligne à un métabolite échangé ou à un intermédiaire. Le terme  $s_{ij}$  de la matrice  $\mathbf{S}$  ainsi formée représente le coefficient stœchiométrique du composé  $x_i$  dans la réaction  $r_j$ . Un bilan massique est ensuite effectué pour chaque composé impliqué dans le réseau de réactions. Il peut être simplifié en se plaçant dans l'approximation des états quasi stationnaires ou en considérant que certains processus sont gelés, en fonction des valeurs relatives des temps caractéristiques du système et des processus considérés (cf. figure I.A.2.1).

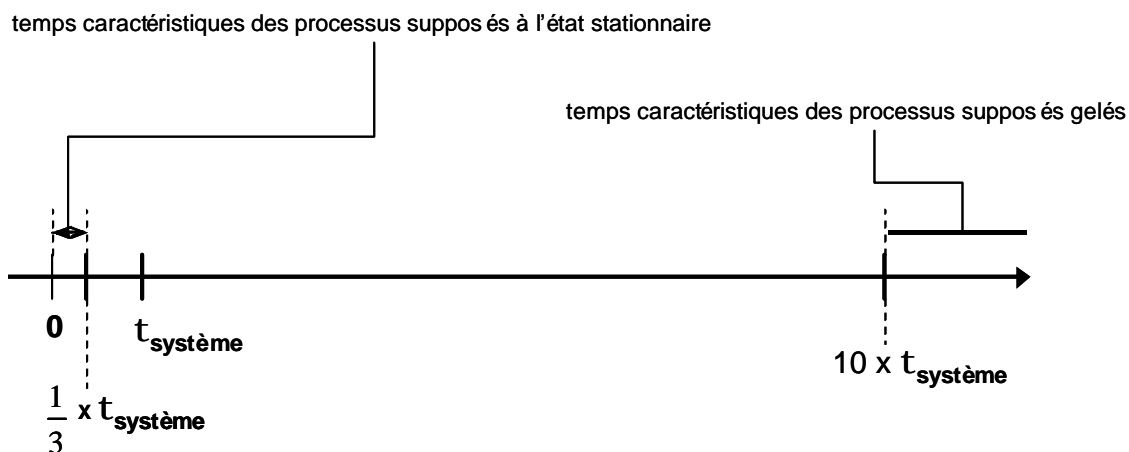


Fig. I.A.2.1 Domaines de validité des hypothèses simplificatrices

Les processus métaboliques peuvent donc être significativement simplifiés en ignorant les réactions ou les voies caractérisées par des échelles de temps qui sont en dehors de celle du système étudié [Stephanopoulos et al. (1998)]. L'ensemble des calculs des bilans et les hypothèses simplificatrices sont détaillés au paragraphe II.D.10 du chapitre II.

Ils conduisent à une équation matricielle de la forme  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{b}$  où  $\mathbf{v}$  est le vecteur des  $n$  flux métaboliques et  $\mathbf{b}$  le vecteur des demandes métaboliques connues. Cette équation peut être réécrite sous la forme  $(\mathbf{S}_{mn} - \mathbf{I}_m) \cdot \mathbf{R}_{n+m} = \mathbf{0}$  [Vanrolleghem et Heijnen (1998)]. Ce système linéaire est habituellement sous-déterminé car le nombre de réaction  $n$  est typiquement supérieur au nombre de

métabolites  $\mathbf{m}$  [Stephanopoulos et *al.* (1998)], il est donc nécessaire de fixer des vitesses pour le résoudre. Le nombre de degrés de liberté  $\mathbf{F}$  du système d'équations de flux est égal à :  $\mathbf{n} + \mathbf{p} - \text{rang}(\mathbf{S})$

- Si  $\mathbf{F}$  flux sont mesurés, le système est déterminé et sa solution est unique
- Si plus de  $\mathbf{F}$  flux peuvent être mesurés, le système est sur-déterminé. Des équations supplémentaires peuvent être utilisées pour tester la cohérence des bilans globaux, la précision de la mesure des flux, la validité de l'approximation des états quasi stationnaires et pour calculer des valeurs plus précises pour les flux intracellulaires inconnus mais aussi une meilleure estimation des flux mesurés
- Si moins de  $\mathbf{F}$  flux sont mesurés, le système est sous-déterminé et les flux inconnus ne peuvent être calculés que si des contraintes supplémentaires sont introduites et un critère global d'optimisation est imposé sur les bilans métaboliques

La méthode de résolution du système d'équations de flux utilisée dans cette étude est détaillée au paragraphe II.D.10.d du chapitre 2.

Les mesures extracellulaires sont les principales données utilisées dans les méthodes de détermination des flux intracellulaires. De manière évidente, la résolution des flux qui peut être réalisée à l'aide des seules méthodes extracellulaires est limitée. Des mesures de flux supplémentaires ou des ratios de flux à certains embranchements peuvent être mesurés en utilisant le marquage isotopique [Stephanopoulos et *al.* (1998)]. Si des expériences sont conduites sur des substrats enrichis au  $^{13}\text{C}$  et que les fractions de métabolites intracellulaires enrichies au  $^{13}\text{C}$  sont mesurées, il est possible d'appliquer un groupe de contraintes supplémentaires dans le modèle et une meilleure estimation des flux intracellulaires peut alors être obtenue [Nielsen (1998)]. Ces mesures sont suffisantes pour déterminer des sous-systèmes du génotype métabolique complet et cela est fréquemment adéquat pour répondre à la question posée. Cependant, la mesure des flux intracellulaires n'est pas toujours aisée [Edwards et Palsson (1998)].

Une approche plus générale pour déterminer la distribution des flux dans le réseau métabolique implique l'utilisation des techniques d'optimisation linéaire qui permet de choisir une seule des solutions possibles du système d'équations du bilan des masses. En effet, coupler la stœchiométrie et les réactions permet d'estimer des contraintes sur les quantités de nutriments spécifiques qui sont utiles pour la croissance et le métabolisme et ainsi déterminer la distribution des nutriments dans les

voies métaboliques. Ces contraintes permettent de réduire le degré de liberté du système d'équations représentant la cellule et de passer d'une infinité de solutions à un groupe d'expressions algébriques résultant des bilans massiques [Varma et Palsson (1994)]. Un objectif sous forme d'une fonction est fixé et un algorithme d'optimisation linéaire sous contraintes, par exemple la méthode du "simplex" utilisée classiquement, permet de trouver une solution particulière au système d'équations de flux en cherchant la valeur minimale ou maximale de l'objectif dans le domaine défini par la stœchiométrie [Savinell et Palsson (1992)]. Ces auteurs ont montré que l'optimisation linéaire peut fournir des informations utiles sur les objectifs du métabolisme cellulaire, les interactions des nutriments avec les besoins de la cellule, les rendements en énergie et en biomasse des nutriments ainsi que la sensibilité de la croissance aux limitations des différentes réactions.

## **Etape n°2 : choix *a priori* du modèle métabolique proposé**

Une fois le réseau métabolique construit, il faut s'assurer que le modèle n'est pas singulier pour le système choisi i.e. pour le réseau métabolique et les vitesses définies [Vanrolleghem et Heijnen (1998)]. En cas de singularité, quand le déterminant de **S** est nul, la solution ne pourra être obtenue sans l'introduction de nouvelles informations [Stephanopoulos et *al.* (1998)] :

- Suppression des voies linéairement dépendantes, particulièrement celles qui sont inactives dans les conditions expérimentales
- Ajout d'informations sur les voies linéairement dépendantes (par exemple une corrélation entre les flux dans ces voies)

L'évaluation de la singularité exige l'utilisation d'un logiciel de calcul symbolique car certains paramètres du modèle métabolique peuvent encore rester sans valeurs numériques. Parmi ces coefficients inconnus, on retrouve toujours les paramètres énergétiques du métabolisme cellulaire, par exemple la demande d'énergie pour la maintenance ou le rapport  $\frac{P}{O}$  i.e. la quantité d'ATP produit dans la chaîne de transport des électrons par oxygène réduit [Vanrolleghem et Heijnen (1998)].

Après avoir vérifié la non singularité, la cohérence de toutes les réactions avec les contraintes thermodynamiques est étudiée. Les réactions irréversibles doivent avoir une direction de flux

cohérente avec les lois de la thermodynamique pour toutes les conditions existantes. Le signe de toutes les vitesses de réaction calculées comme solution symbolique du réseau métabolique est de ce fait déterminé [Vanrolleghem et Heijnen (1998)].

### **Etape n°3 : estimation des paramètres inconnus du modèle**

Quelques coefficients stœchiométriques du réseau restent inconnus après examen de toutes les connaissances biochimiques disponibles. Dans cette étape de modélisation du réseau métabolique, des valeurs doivent être attribuées à ces paramètres en ajustant les prédictions du modèle aux données expérimentales [Vanrolleghem et Heijnen (1998)].

En batch ou en fed-batch, il faut garder à l'esprit que seule une partie des points expérimentaux est utile pour le développement du modèle, ce sont les données recueillies quand l'environnement reste relativement inchangé [Stephanopoulos et *al.* (1998)]. Le calcul des flux est basé sur la mesure de vitesses spécifiques de consommation de substrats et de production de métabolites extracellulaires qui représentent les flux vers et hors des cellules. Avant de faire un tel calcul différentiel, il est important de confirmer la cohérence des données. Il existe deux approches pour évaluer la cohérence des données expérimentales [Stephanopoulos et *al.* (1998)] :

- La première est basée sur un modèle métabolique très simple, baptisé modèle boîte noire, où toutes les réactions cellulaires sont réunies en une seule décrivant la croissance cellulaire globale. Elle consiste basiquement à vérifier les bilans élémentaires. De plus elle est plutôt simple à mettre en œuvre car les seules informations nécessaires sont les compositions élémentaires des substrats, des produits, de la biomasse ainsi que les vecteurs flux vers et hors de la biomasse. La composition élémentaire de cette dernière dépend de sa composition macromoléculaire et donc des conditions de croissance. Cependant, en dehors des conditions extrêmes, il est correct d'utiliser la formule élémentaire moyenne  $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$  quand la composition de la biomasse n'est pas connue avec précision.
- La seconde prend en compte beaucoup plus de détails biochimiques dans la conversion globale des substrats en biomasse et produits. En tant que telle, elle est mathématiquement beaucoup plus

complexe mais apporte bien sûr une description plus réaliste des degrés de liberté effectifs dont on dispose pour les données. Toutefois, une telle analyse peut se révéler fastidieuse.

Après identification et correction des mesures suspectes, les vitesses estimées, dont la précision a été améliorée, peuvent être utilisées pour calculer une meilleure estimation des flux métaboliques. Pour une analyse quantitative du métabolisme, les données expérimentales traitées doivent être [Stephanopoulos et *al.* (1998)] :

- Complètes, ce qui ne signifie pas que tous les substrats et produits sans exception doivent être mesurés mais que ceux présents en quantité significative doivent être quantifiés pour vérifier les bilans carbone et azote voire dans certains cas phosphore et soufre. Cette exigence requiert l'utilisation de milieux salins définis et élimine pratiquement les milieux complexes pour les études métaboliques systématiques.
- Non bruitées, autant que possible car les vitesses spécifiques sont dérivées des mesures de concentrations qui, dans le cas où elles sont bruitées, rendent le calcul difficile. De ce fait, un aspect important de l'analyse quantitative du métabolisme cellulaire est le développement de techniques analytiques fiables et précises ainsi que l'utilisation de bioréacteurs instrumentés, pilotés et supervisés par informatique, où les variables d'état les plus importantes sont mesurées en ligne.

Dans le cadre de cette étude, le modèle a été paramétré en utilisant des données réconciliées (cf. paragraphe II.D.9.a, chapitre II). Les variables estimées par réconciliation ont un écart type plus faible que les mesures expérimentales, elles sont donc potentiellement plus fiables que les valeurs mesurées [Stephanopoulos et *al.* (1998)].

#### **Etape n°4 : validation du modèle construit**

Dans un premier temps, l'acceptabilité biochimique des coefficients déterminés dans l'étape précédente est vérifiée. Par exemple, il est inacceptable d'obtenir des valeurs négatives pour le rapport

$\frac{P}{O}$  ou la maintenance. La non violation des contraintes thermodynamiques est également vérifiée.

Dans un second temps, le réseau métabolique doit être validé en confrontant les prédictions du modèle

avec des données expérimentales indépendantes de celles utilisées pour l'estimation des paramètres lors de l'étape précédente [Vanrolleghem et Heijnen (1998)].

### I.A.3. Modèles dynamiques

Varma et Palsson (1994) montrent que si les conditions initiales de culture sont connues, un modèle de type MFA est capable de prédire les profils dans le temps de la croissance et des concentrations en produits pour des cultures discontinues et discontinues alimentées. Pour la prédictions des profils temporels des métabolites consommés et excrétés en batch et en fed-batch, Varma et Palsson (1994) divisent le temps de fermentation en petits intervalles de temps  $\Delta t$  puis utilisent un algorithme itératif :

- Calcul de la concentration à l'instant  $t$  :  $S_c = S_{c0} + \frac{\text{ajout} \times \Delta t}{\text{volume}}$  avec  $S_{c0}$  la concentration à l'instant  $t-1$

- Calcul du substrat disponible :  $S_d = \frac{S_c}{X \times \Delta t}$

- Calcul du substrat consommé  $S_u < S_d$ , de  $\mu$  et  $P$  à partir du modèle

- Calcul des concentrations au temps suivant :  $\frac{dX}{dt} = m \times X \Rightarrow X = X_0 \times e^{\mu \times \Delta t}$

$$\text{et } \frac{\partial S_c}{\partial t} = -S_u \times X \Rightarrow S_c = S_{c0} + \frac{S_u \times X}{m} \times (1 - e^{m \times \Delta t})$$

### I.A.4. Limitations de MFA

Comme les transitions métaboliques sont rapides, ces modèles sont applicables aux procédés faisant intervenir la croissance cellulaire. En effet, les transitions de ces procédés sont plus lentes que celles associées au métabolisme [Savinell et Palsson (1992)].

L'approche MFA est cependant limitée par différents aspects [Varma et Palsson (1994)] :

- La stœchiométrie est connue et fixée. L'addition ou la suppression de réactions due à l'induction ou à la répression des gènes n'est pas considérée.

- La matrice stœchiométrique ne prend pas en compte explicitement les contraintes thermodynamiques car elle ne contient pas de variables de concentration. Par conséquent les flux calculés peuvent prendre des valeurs impossibles à obtenir *in vivo*. Une information thermodynamique grossière peut être incorporée en distinguant les réactions réversibles et irréversibles.
- Enfin, d'autres contraintes cellulaires ne sont pas prises en compte dans cette approche comme les vitesses de réplication, de transcription et de traduction de l'ADN, les limitations du transport...

Ce type de modèle peut ainsi très bien prédire les transitions métaboliques mais il ne peut pas décrire le cas où il y a des changements régulatoires (par exemple la phase de latence des cultures). Varma et Palsson (1994) ont appliqué ce type de modèle à une culture batch d'*E.coli*. La simulation donne une bonne prédiction sauf pour le temps de transition entre la consommation de glucose et celle d'acétate, puisque la transition entre les différentes utilisations des voies métaboliques est fonction des processus de régulation génétique qui ne sont pas pris en compte dans ces modèles.

#### I.A.5. Applications de MFA à l'étude des *Streptomyces*

Des modèles métaboliques de *Streptomyces* n'ont été construits et publiés que relativement récemment. Ils concernent trois souches : *S.noursei*, *S.coelicolor* et *S.lividans* ; la première est productrice de nystatine, un antifongique, et les deux dernières sont productrices entre autre d'actinorhodine, un pigment aux propriétés antibiotiques faibles. *S.coelicolor* produit donc des antibiotiques sans valeur commerciale mais facilement identifiables ; c'est devenu un microorganisme modèle pour les études génétiques et physiologiques des *Streptomyces*.

Ces travaux ont permis de construire des modèles d'analyse de flux ([Naeimpoor et Mavituna (2000), (2001), Avignone Rossa et *al.* (2002), Hong Bum Kim et *al.* (2004)]), d'analyse de flux couplé au marquage isotopique [Jonsbu et *al.* (2001)] et d'analyse de sensibilité [Daae et Ison (1999)]. Ces modèles sont purement stœchiométriques ; Roubos et *al.* (1999, 2001) ont quant à eux développé des modèles semi-stœchiométriques ou hybrides qui couplent MFA avec des modèles phénoménologiques.

### I.A.5.a. Modèles MFA

#### I.A.5.a.1. Modèles métaboliques mis en œuvre

Daae et Ison (1999) ont construit un modèle de 57 réactions impliquant 53 métabolites, issues des connaissances biochimiques disponibles pour d'autres bactéries. Certaines spécificités du métabolisme de *S.lividans* sont prises en compte : la voie d'Entner-Doudoroff n'est pas fonctionnelle, la 6-phosphogluconate deshydrogénase est NAD dépendante, le cycle glyoxylique n'est pas fonctionnel et la néoglucogénèse fonctionne par l'intermédiaire de la PEP-carboxykinase. La biomasse est considérée comme le produit de la condensation de 38 monomères. La composition de la biomasse en monomères ainsi que l'énergie nécessaire à leur polymérisation sont issues des données disponibles pour *E.coli*. Le réseau métabolique prend en compte la consommation de substrats (glucose et alanine), la respiration, la production d'acides (pyruvate et AKG), la dissipation d'énergie sous forme d'hydrolyse d'ATP (toutefois l'ATPase maintenant le gradient de proton entre le milieu extérieur et le cytoplasme n'est pas modélisée). Le rapport  $\frac{P}{O}$  est supposé égal à 2 pour la régénération des NADH et à 1,33 pour celle des FADH<sub>2</sub>. Avignone Rossa et *al.* (2002) se sont basés sur ce modèle métabolique en rajoutant les voies de biosynthèse de l'actinorhodine (ACT) et de l'undecylprodigiosine (RED) et en condensant certaines voies linéaires. Le glucose est transporté par une glucokinase ATP dépendante, la seule enzyme impliquée dans les voies anaplérotiques est la PEP-carboxylase et il n'y a pas d'activité transhydrogénase. Ils obtiennent ainsi un modèle comprenant 36 ou 38 réactions impliquant 46 ou 47 métabolites (suivant le substrat considéré).

Naeimpoor et Mavituna (2000), (2001) ont construit un modèle de plus de 200 réactions comprenant la glycolyse, la voie des pentoses-phosphate (ou voie PPP), les cycles TCA et glyoxylique, les voies anaplérotiques, le pool des folates, les réactions de la thioredoxine, la transhydrogénase et la voie de production d'ACT. La structure de la biomasse dans ce modèle est légèrement plus élaborée, elle est considérée comme la somme pondérée de macromolécules (protéines, acides nucléiques, phospholipides et polysaccharides). Les pourcentages des deux premières sont issues de données expérimentales, le pourcentage de phospholipides est supposé identique aux valeurs disponibles pour *E.coli* et le reste des macromolécules est supposé être des polysaccharides. La quantité de monomères



pour former ces macromolécules ainsi que l'énergie nécessaire à leur polymérisation sont issus des données disponibles pour *E.coli*. L'énergie est divisée en trois composantes : l'énergie nécessaire à l'anabolisme (proportionnelle à  $\mu$ ), à la sécrétion de produits (proportionnelle à  $v_p$ ) et à la maintenance (supposée variable suivant les conditions). Les produits sont divisés en trois catégories, métabolites primaires ( $\text{CO}_2$ , éthanol, lactate...), secondaires (après chute du taux de croissance, par exemple ACT) et intermédiaires (les métabolites d'overflow). Ces derniers sont produits en situation d'excès de carbone, leur type dépend largement de la nature du facteur limitant la croissance et de la physiologie de l'espèce. Le rapport  $\frac{P}{O}$  est supposé égal à 1,9 pour la régénération des NADH et 1,2 pour la régénération des  $\text{FADH}_2$ .

Hong Bum Kim et *al.* (2004) se sont inspirés de ce modèle ainsi que d'un modèle métabolique de *C.glutamicum* décrivant la production de glutamate [Takac et *al.*(1998)] ; ils ont été regroupés et le résultat inclut plus de 400 réactions dont les productions de pyruvate, d'acétate, de formate, de glycérol et de CDA (calcium-dépendant antibiotique). La composition de la biomasse est supposée constante au cours de la fermentation et les mêmes valeurs que précédemment sont utilisées pour le rapport  $\frac{P}{O}$ .

Jonsbu et *al.* (2001) se sont basés sur un modèle métabolique de *P.chrysogenum* [Christensen et Nielsen (2000)], qui comprend 25 réactions impliquant 11 métabolites, en prenant en compte certaines spécificités du métabolisme de *S.noursei*. Ainsi la glucose-6-phosphate déshydrogénase est-elle uniquement NADPH dépendante et il n'y a pas d'activité transhydrogénase.

#### I.A.5.a.2. Méthodes de résolution

Daae et Ison (1999) indiquent qu'ils doivent fixer 6 vitesses parmi le taux de croissance ( $\mu$ ), les vitesses spécifiques de consommation de glucose ( $q_s$ ), d'alanine ( $q_{\text{alanine}}$ ), d'oxygène ( $q_{\text{O}_2}$ ), de production de  $\text{CO}_2$  ( $q_{\text{CO}_2}$ ), de pyruvate ( $v_{\text{pyruvate}}$ ) et d' $\alpha$ -cétoglutarate ( $v_{\text{AKG}}$ ) pour résoudre le système d'équations de flux. Par ailleurs, les vitesses  $q_s$ ,  $q_{\text{CO}_2}$ ,  $q_{\text{O}_2}$ ,  $v_{\text{pyruvate}}$  et  $v_{\text{AKG}}$  sont redondantes. Ensuite, ils analysent l'impact sur les flux calculés d'une perturbation sur les flux mesurés en calculant

$\frac{dr_c}{dr_m} = -E_c^\# \cdot E_m$  avec  $r_c$  le vecteur des flux calculés,  $r_m$  le vecteur des vitesses mesurées,  $E_c^\#$  la pseudo-

inverse de la matrice extraite de la matrice stœchiométrique qui contient les colonnes correspondantes à  $r_c$  et  $E_m$  la matrice extraite de la matrice stœchiométrique qui contient les colonnes correspondantes à  $r_m$ . Ils évaluent également l'impact sur les flux calculés d'un changement de composition de la biomasse en calculant  $\frac{1}{r_x} \cdot dr_c \cdot dE_x^\# = -E_c^\#$ , avec  $E_x$  la matrice extraite de la matrice stœchiométrique qui contient les colonnes correspondantes à  $r_x$ .

Avignone Rossa et *al.* (2002) qui utilisent un réseau métabolique similaire doivent fixer 9 vitesses ( $\mu$ ,  $q_s$ ,  $q_{NO_3}$ ,  $q_{CO_2}$ ,  $q_{O_2}$ ,  $v_{pyruvate}$ ,  $v_{AKG}$ ,  $v_{citrate}$ ,  $v_{lactate}$  et  $v_{ACT}$ ) puis calculent les distributions de flux à partir des valeurs expérimentales de ces vitesses.

Naeimpoor et Mavituna (2000, 2001) résolvent le système d'équations de flux par optimisation linéaire en utilisant le simplex. La fonction optimisée est soit le taux de croissance, soit l'énergie dissipée pour la maintenance. Dans le premier cas, deux grandeurs optimisées sont définies :  $\mu_{stoechiométrique} = \max(\mu)$  à  $q_s$  fixé ; et  $\mu_{théorique} = \max(\mu)$  à  $q_s$ ,  $q_{CO_2}$ ,  $q_{O_2}$ ,  $v_{ACT}$  fixés. Dans le second cas, l'énergie dissipée pour la maintenance est maximisée à  $q_s$ ,  $q_{CO_2}$ ,  $q_{O_2}$ ,  $v_{ACT}$ ,  $\mu_{mesuré}$  fixés. Le résultat donne la valeur supérieure des besoins énergétiques dans le cadre des contraintes imposées. Afin d'étudier l'effet de différentes situations de limitation en azote, une dernière grandeur optimisée est définie :  $\mu_{maximisé} = \max(\mu)$  à  $q_s, q_{azote}$  et composition de biomasse fixées. La solution calculée par optimisation correspond à un cas théorique pour lequel les flux calculés sont les valeurs optimisées de manière à atteindre l'objectif de l'optimisation sous contraintes des vitesses expérimentales fixées. Par ailleurs, la composition de la biomasse est supposée constante dans tous ces cas de figures. Hong Bum Kim et *al.* (2004) calculent également des distributions de flux par optimisation en maximisant soit  $\mu$  à  $q_s$  fixé, soit  $v_{ACT}$  à  $\mu$  et  $q_s$  fixés.

Jonsbu et *al.* (2001) basent leur calcul de flux sur le schéma de marquage des acides aminés dans les protéines. Cette technique est applicable lorsque l'état physiologique du microorganisme est stable, ce qui n'est généralement pas le cas lors des cultures discontinues. Les flux calculés en utilisant cette

technique lorsque le métabolisme change ne sont pas les flux *in vivo* mais une valeur intégrant le changement par rapport à un état initial stable (d'où le terme "integrated flux").

#### I.A.5.a.3. Résultats

Daae et Ison (1999) à travers une analyse de sensibilité montrent que les paramètres les plus influents pour le calcul de la distribution des flux dans leur réseau métabolique sont  $\mu$ ,  $q_{O_2}$  et  $v_{AKG}$ . Comme la variation de  $\mu$  est un ordre de grandeur inférieure à celle des autres vitesses, elle est en fait peu influente pour le calcul des flux. Selon les auteurs, le paramètre le plus influent serait donc  $q_{O_2}$  ce qui leur semble logique car la consommation d'oxygène est liée à la production d'énergie mais ils ne concluent pas sur l'influence de  $v_{AKG}$  qui est comparable à celle de  $q_{O_2}$  (sensibilité logarithmique cumulée de 12,12 et 12,35 pour respectivement  $v_{AKG}$  et  $q_{O_2}$  avec des sensibilités individuelles des réactions à une perturbation sur ces deux paramètres comparables). Le flux le plus affecté par une perturbation sur les vitesses fixées pour calculer les flux est celui dans la voie de dissipation d'énergie (hydrolyse de l'ATP) ; le choix de valeurs arbitraires et fixes pour la stœchiométrie des réactions de phosphorylation oxydative n'est toutefois pas discuté. L'équilibre énergétique de la cellule serait donc facilement perturbé par les paramètres externes. Par ailleurs, la sensibilité des flux à une variation de 20% des quantités de monomères de la biomasse s'avère négligeable (la sensibilité individuelle la plus importante est de 8%, la sensibilité moyenne est de 0,2%). Cependant ce calcul est effectué pour un taux de croissance de  $0,15 \text{ h}^{-1}$ , or la composition de la biomasse change habituellement suite à une carence ou à une limitation nutritionnelle i.e. à faibles  $\mu$  [Martin et Demain, 1980]. Naeimpoor et Mavituna (2000) ont également étudié la sensibilité des flux à la variation des vitesses fixées et montrent que le paramètre le plus influent est  $q_s$  alors que le moins influent est  $v_{ACT}$ . Hong Bum Kim et *al.* (2004) en réalisant un calcul similaire montrent que la sensibilité maximale du flux dans la voie de biosynthèse du CDA est 2,6%.

Ces auteurs montrent que le taux de croissance maximisé sous contraintes est égal à deux fois le taux de croissance mesuré expérimentalement, ce qu'ils expliquent par le fait que la capacité maximale de croissance de la souche n'est pas exploitée expérimentalement. Naeimpoor et Mavituna (2000) ont étudié les taux de croissance optimisés de deux manières différentes (cf. paragraphe I.A.5.a.2) dans

quatre situations de limitation différentes (N, P, K, S). Il apparaît que  $\mu_{\text{stoéchiométrique}}$  est supérieur à  $\mu_{\text{théorique}}$  ce qui est logique étant donné que la même valeur de  $q_s$  est utilisée dans les deux cas et qu'il n'y a pas de formation de produits dans le premier cas. Par ailleurs, l'écart entre  $\mu_{\text{théorique}}$  et  $\mu_{\text{mesuré}}$  est le plus grand dans le cas d'une limitation azote, le plus faible dans le cas d'une limitation phosphore et intermédiaire dans le cas des limitations potassium et soufre. En comparant le taux de croissance optimisé dans le cas de croissances sur nitrate ou sur ammonium, il apparaît que  $\mu_{\text{NH}_4}$  est supérieur  $\mu_{\text{NO}_3}$  ce qui est naturel puisque la réduction des nitrates requiert un besoin supplémentaire de NADPH qui n'est pas utilisé pour la croissance.

Daae et Ison (1999) étudient les signes des sensibilités des flux et en déduisent que l'augmentation du taux de croissance entraînerait une augmentation du flux dans la voie PPP concomitant de la diminution du flux dans la chaîne respiratoire et de l'accélération de l'hydrolyse d'ATP. Cette dernière variation serait due à un excès de production d'ATP dans les voies glycolytiques. Avignone Rossa et *al.* (2002) modélisent les flux intracellulaires pour deux types de substrats différents : glucose et gluconate. Sur glucose, le flux dans la voie PPP tend vers zéro quand le taux de croissance est quasiment nul (cas des phases stationnaires en culture discontinues), il augmente lorsque  $\mu$  augmente. Sur gluconate, le flux calculé pour la voie PPP est supérieur au cas de la culture sur glucose et augmente avec l'augmentation de  $\mu$ . Il représente 25 à 40% du flux de carbone entrant. Le calcul des flux intégrés en utilisant le marquage isotopique par Jonsbu et *al.* (2001) montre que le flux dans la voie PPP est égal au flux dans la glycolyse pendant la phase exponentielle de croissance. De plus, cette modélisation indique une augmentation du flux dans le cycle TCA ainsi qu'une diminution du flux dans la voie PPP quand la croissance ralentit, confirmant les études de Daae et Ison (1999) et d'Avignone Rossa et *al.* (2002). Au contraire, le modèle de Hong Bum Kim et *al.* (2004) indique que le flux dans la glycolyse est supérieur au flux dans la voie PPP pendant la phase exponentielle de croissance mais que ce rapport s'inverse quand  $\mu$  diminue et que la production d'antibiotique s'intensifie.

Naeimpoor et Mavituna (2000) montrent que la production d'ACT est maximale dans le cas d'une limitation en azote et que la production de co-produits est également la plus importante dans ce cas. Le flux dans la voie PPP serait alors nul. Par ailleurs, lorsque  $q_{\text{ACT}}$  est fixé à zéro, il n'apparaît pas de

différence significative avec la précédente distribution de flux. Enfin, l'optimisation de  $\mu$  à composition de biomasse constante,  $q_s$  et différentes valeurs de  $q_{\text{azote}}$  fixées montre que lorsque  $q_{\text{azote}}$  diminue,  $\mu_{\text{maximisé}}$  diminue et  $v_p$  augmente ce qui semble cohérent car le glucose non converti en biomasse est transformé en produits. En revanche, il n'y aurait production d'ACT uniquement sur nitrate à taux de croissance (imposé par la limitation) égal. Dans ce cas, le flux de carbone remonte la glycolyse pour alimenter la voie PPP. Ce cas de figure est également présent dans l'étude d'Avignone Rossa et *al.* (2002).

Avignone Rossa et *al.* (2002) mettent également en évidence le fait que le flux dans la voie PPP est inversement proportionnel à la vitesse spécifique de production d'antibiotique. Ils indiquent que le besoin en NADPH pour produire un gramme d'antibiotique est un ordre de grandeur plus élevé que pour produire un gramme de biomasse. Toutefois, la demande en NADPH pour la production d'antibiotique n'affecte pas significativement les flux d'après leur modèle. Le flux dans la voie PPP pour les mutants surproducteurs n'est supérieur que de 5% par rapport au flux dans la souche sauvage. Il n'y a également pas de différence significative dans les flux cataboliques donc la production d'antibiotique ne serait pas exagérément demandeuse d'énergie par rapport à la formation de biomasse. Ces auteurs formulent l'hypothèse que les antibiotiques sont produits seulement lorsqu'il y a un excès de précurseurs lors de la diminution du taux de croissance. En condition de croissance non limitée, les formations de biomasse et d'antibiotique seraient en compétition et la première serait favorisée. Jonsbu et *al.* (2001) indiquent que les besoins en NADPH pour produire un gramme de nystatine sont cinq fois plus élevés que pour faire un gramme de biomasse. Leur contexte expérimental est différent puisque cet antifongique est produit à taux de croissance élevé ( $0,14 \text{ h}^{-1}$ , phase "P1"), la production étant plus intense quand  $\mu$  diminue (phase "P2"). Le besoin en NADPH est deux fois plus élevé pendant P1, car  $\mu_{\text{P1}} \gg \mu_{\text{P2}}$ , et NADPH provient alors pour moitié de la voie PPP et du cycle TCA. La diminution du flux dans la voie PPP lors de P2 (lorsque  $v_{\text{nystatine}}$  augmente) serait due à la diminution des besoins en NADPH pour l'anabolisme ; le cofacteur proviendrait alors majoritairement du cycle TCA. Ils notent que le NADPH formé serait en excès lors des deux phases de production.

Il existe donc une intéressante variété de modèles et d'interprétation qui peuvent en être tirées. Ce sont des modèles d'étude de la physiologie cellulaire qui ont pour but de mettre en évidence des mécanismes de régulation du métabolisme cellulaire. L'information essentielle qui peut être retenue est que tous les cas de figures envisageables pour la distribution des flux dans les voies centrales peuvent être obtenus suivant les conditions expérimentales ou les techniques d'optimisation linéaire. Par ailleurs, ces flux intracellulaires ne semblent pas être fondamentalement perturbés lors de la variation de la cinétique de production d'antibiotique. En inversant le raisonnement, il peut être déduit que la détermination du flux dans la voie de biosynthèse d'un antibiotique est difficilement réalisable par la seule mesure de flux extracellulaires, i.e. par une approche purement MFA. En revanche, ces modèles montrent qu'ils donnent accès à des connaissances intéressantes sur le métabolisme central du microorganisme mis en œuvre. Excepté le modèle de Jonsbu et *al.* (2001), ils ne tiennent en revanche pas compte du changement de composition de la biomasse provoqué par une limitation ou une carence nutritionnelle qui restent les principaux facteurs déclenchant le métabolisme secondaire chez *Streptomyces* (cf. paragraphe I.B.). La stratégie de modélisation qui semble la plus judicieuse à mettre en œuvre en l'état actuel des connaissances pour décrire une biosynthèse d'antibiotique est la construction d'un modèle hybride permettant de décrire la structure de la biomasse et son évolution à partir de l'analyse des flux, puis de relier la voie de biosynthèse du métabolite secondaire considéré à cette structure centrale.

#### I.A.5.b. Modèles hybrides

##### I.A.5.b.1. Généralités

Roubos et *al.* (1999, 2001) indiquent que la compréhension globale des cinétiques de réaction est irréalisable dans de nombreux cas. La construction de modèles cinétiques les approximant peut être utilisée pour maximiser le rendement de production d'un métabolite d'intérêt. Ces modèles cinétiques rassemblent de nombreux paramètres et de nombreuses hypothèses sur le fonctionnement cellulaire. L'intégration d'un réseau métabolique dans ces modèles est souhaitable parce qu'il décrit les relations entre les consommations et les productions en se basant sur la stœchiométrie des réactions biochimiques qui est une donnée incontournable. De plus, il apporte des informations *a priori* sur le

comportement potentiel de la cellule et intègre des contraintes incontournables comme la conservation des différents éléments (C, N, P, K, S...) dans le modèle complet.

Les techniques de modélisation hybride sont basées sur cette démarche et permettent de construire un modèle à partir d'un nombre réduit de données. Un modèle hybride se divise en trois parties :

- Equation physique : loi de conservation de la matière
- Réseau métabolique : principales réactions biochimiques dans la cellule qui transforment les substrats en biomasse et produits. Il a un nombre réduit de degrés de liberté et impose des contraintes métaboliques au modèle global
- Modèles "boîte-noire" : étant donné que le réseau métabolique décrit les réactions de manière statique, le comportement dynamique du système est modélisé par des modèles non structurés, ou "boîte-noire". Ils sont basés sur l'observation des cinétiques macroscopiques au sein du bioréacteur et généralement selon le formalisme de Monod [Monod (1958)] ou sur des équations de même type globalisant les différentes réactions enzymatiques produisant la biomasse ou les métabolites excrétés.

Les paramètres des modèles "boîte-noire" sont estimés à partir de mesures expérimentales selon deux approches possibles :

- L'approche directe dans laquelle les valeurs de sortie des modèles sont estimées à partir des données expérimentales en amont. Puis le paramétrage adéquat pour que les valeurs de sortie soient acceptables est déterminé en utilisant par exemple des réseaux de neurones ou la logique floue. Une difficulté est l'estimation des valeurs de sortie qui sont des vitesses de réaction, donc des informations différentielles difficiles à extraire des mesures expérimentales biaisées. D'autant plus qu'elles peuvent être transformées en vitesses spécifiques donc divisées par la variable biomasse qui est généralement déterminée de manière peu précise.
- L'approche intégrale dans laquelle les paramètres de ces modèles sont déterminés directement par apprentissage du modèle hybride complet, en définissant un critère de performance et en ajustant les paramètres des modèles "boîte-noire" pour le maximiser. Ceci peut être réalisé à l'aide d'algorithmes génétiques.

#### I.A.5.b.2. Exemples d'application

##### I.A.5.b.2.i. *Modélisation hybride d'une culture batch*

Roubos et *al.* (1999) ont appliqué cette stratégie pour modéliser la production d'acide clavulanique par *S.clavuligerus* en culture batch. Un réseau métabolique comprenant 86 réactions a été construit ; certaines réactions peuvent être ajoutées ou retirées du modèle en fonction des paramètres environnementaux pour simuler l'activation ou la répression de voies. En effet, la dynamique des cultures batch est caractérisée par la succession de différentes phases durant lesquelles certaines voies peuvent être actives ou non : croissance exponentielle, phase de ralentissement, limitation en substrat puis double limitation en substrats

Le modèle métabolique s'est avéré incapable de décrire correctement la production d'antibiotique, cette dernière est donc découplée du réseau métabolique. Le degré de liberté est réduit à trois et cinq fonctions dynamiques peuvent être utilisées pour modéliser la culture. La cinétique de production d'antibiotique est modélisée de manière phénoménologique en utilisant un modèle d'inhibition par les substrats (glycérol et phosphate) ; les paramètres de ce modèle ainsi que ceux du modèle de consommation de substrats sont déterminés par une approche directe. Le modèle hybride intègre également la dynamique de lyse cellulaire et de dégradation de l'antibiotique. Les données utilisées pour le paramétrage et la validation du modèle sont enregistrées lors de cultures en bioréacteur instrumenté (maîtrise de l'environnement, analyse en ligne des gaz). Leur cohérence est vérifiée en calculant les bilans matière ; il apparaît qu'ils ne sont vérifiés que pour la phase exponentielle, le déficit constaté pour les phases suivantes pouvant être attribué à l'omission de produits non dosés ou à la lyse cellulaire. C'est ce dernier phénomène qui a été pris en compte dans le modèle.

Les auteurs concluent que le modèle hybride a de bonnes propriétés d'interpolation des données expérimentales. Par ailleurs, il apparaît que la précision du modèle métabolique est déterminante pour la précision des résultats du modèle complet. Enfin, ce type de modèle pourrait avoir certaines capacités d'extrapolation.



#### I.A.5.b.2.ii. *Modélisation hybride d'une culture fed-batch*

Roubos et *al.* (2001) ont mis en œuvre la stratégie ci-dessus pour la modélisation de la production d'acide clavulanique lors d'une culture fed-batch. Cet antibiotique est produit lorsque l'azote ou le phosphore est limitant avec un taux spécifique de croissance inférieur à  $0,05 \text{ h}^{-1}$  ; si  $\mu$  est supérieur à  $0,1 \text{ h}^{-1}$ , il n'y a pas de production. La dynamique des cultures est donc caractérisée par plusieurs phases : phase de croissance non limitée, carence phosphate, puis apport limitant de glycérol/glutamate/phosphate ou ammonium après un délai de cinq heures pendant lequel le taux de croissance descend en dessous de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  ; elles sont réalisées dans un bioréacteur instrumenté, sur un milieu chimiquement défini de manière à pouvoir vérifier les bilans matière.

La composition élémentaire de la biomasse dépend probablement des conditions de croissance ; dans cette étude aucune relation générale n'a été identifiée, elle est donc supposée constante. Par ailleurs, différentes équations stœchiométriques de formation de la biomasse sont définies suivant les phases de la culture ; le modèle métabolique a un seul degré de liberté. La croissance observée lors de la phase de limitation est due à l'accumulation de polysaccharides (leur proportion augmente de 10% tandis que celle des protéines diminue de 55 à 45% ; les proportions d'ADN et d'ARN étant relativement constante, la diminution du pourcentage de phosphate dans la biomasse est sans doute due à un changement de composition de la paroi). Le modèle intègre un coefficient de maintenance qui est considéré constant tout au long de la culture.

La production d'acide clavulanique est supposée démarrer dans l'intervalle de temps situé entre la phase de croissance non limitée et la phase de limitation. *La vitesse spécifique de production est supposée constante et fonction des caractéristiques de l'apport limitant.* Elle s'arrête si la concentration en glycérol est supérieure à  $0,7 \text{ C mole.L}^{-1}$ , ce qui a été déterminé empiriquement. Le modèle prend en compte la cinétique de dégradation de l'antibiotique qui est une fonction affine des concentrations en glycérol et ammonium.

Le modèle intègre enfin des équations modélisant les transferts de matière à l'échelle du bioréacteur, de manière à prendre en compte le fait que le système est ouvert. La vitesse de consommation de glutamate est modélisée par une cinétique de type Monod, la vitesse de consommation de glycérol est déduite du bilan redox et la vitesse de production de  $\text{CO}_2$  est déduite du bilan carbone.

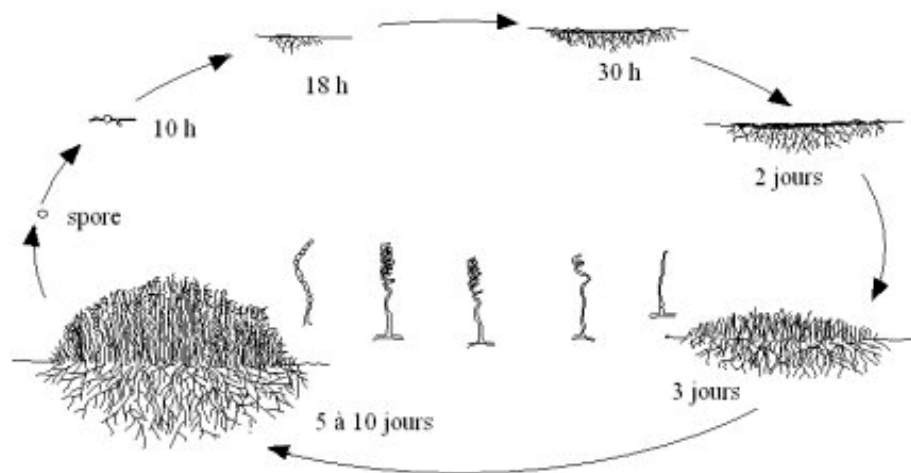
Les différents paramètres sont fixés à une valeur nominale en utilisant les données expérimentales d'une culture préliminaire puis sont affinés à l'aide d'algorithmes génétiques.

Le modèle ainsi construit calcule correctement les résultats expérimentaux dans une large gamme de conditions opératoires mais certains paramètres, comme la vitesse spécifique de production d'antibiotique, varient en fonction de chaque culture. Ce type de modélisation ouvre la perspective de pouvoir calculer des conduites optimales pour la production d'un métabolite d'intérêt.

## I.B. Les *Streptomyces*

### I.B.1. Généralités

Le genre *Streptomyces* (du grec *Streptos* : courbé, tordu et *Myces* : moisissure) appartient au groupe des Streptomycètes dont font également partie les genres *Intrasporangium*, *Kineosporia*, *Sporichthya* et *Streptoverticillium*. Ce sont des bactéries Gram+ avec une proportion de G+C élevée (69 à 78%) formant des colonies à la morphologie complexe. Quatre cents espèces de *Streptomyces* ont été décrites dans un premier temps, puis elles ont été classées dans 19 groupes majeurs (notés A à J) et 40 sous-groupes notés par un chiffre arabe [Hodgson (2000)]. Ils ont un cycle de développement complexe (cf. figure n°I.B.1.1) sur milieu solide : il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes non septés et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium primaire, en effet ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se spiralisent puis se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées ; ces spores sont des agents de dissémination. En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si certains Streptomycètes peuvent sporuler dans cet environnement. [Hodgson (1992)]. En milieu solide, une différenciation morphologique est donc observée (formation du mycélium aérien) tandis qu'en milieu liquide la différenciation est généralement physiologique (activation d'un métabolisme secondaire dans le cas d'un stress nutritionnel ou environnemental ralentissant significativement la croissance).



**Fig. LB.1.1. Cycle de développement d'un *Streptomyces* sur milieu solide**

Les Streptomycètes représentent 20% de la microflore des sols où ils subsistent sous forme de spores [Mayfield et *al.* (1972)]. Ils sécrètent des enzymes et consomment les produits issus de la réaction de ces enzymes avec les polymères insolubles tels que les protéines, l'amidon ou la cellulose provenant des plantes. Il semble clair que leur environnement est riche en polysaccharides mais relativement pauvre en azote et en phosphate. Par ailleurs, ils sont en compétition avec les autres membres de la microflore (bactérie, champignons filamenteux...) dans cet environnement nutritionnellement pauvre. En laboratoire, ils sont capables de pousser sur milieu riche avec des temps de génération atteignant une heure tandis qu'ils s'élèvent à 1,7 jours dans un sol forestier [Mayfield et *al.* (1972)]. Il a été conclu que les Streptomycètes sont des oligotrophes facultatifs i.e. qu'ils peuvent pousser à la fois dans un environnement nutritionnellement riche ou pauvre.

Les Streptomycètes ont la capacité de produire une large gamme de métabolites qui ont des applications importantes en santé humaine et animale. Les plus répandus sont les antibiotiques mais d'autres ont des effets immunosuppresseurs ou sont des inhibiteurs d'enzymes. Ces microorganismes sont une des sources les plus utilisées de métabolites secondaires. Il y a une quinzaine d'années, six milles antibiotiques avaient été identifiés chez les Actinomycètes dont cinq milles chez les Streptomycètes sur un total de 9000 antibiotiques connus [Goodfellow et O'Donnell (1992)]. Environ cinq cents nouveaux antibiotiques sont découverts chaque année dont une part importante proviennent des Streptomycètes qui produisent encore à l'heure actuelle plus de 60% de ces molécules [Demain (2000)]. Cette considérable diversité de composés biologiquement actifs a pour conséquence la grande

importance des Streptomycètes dans l'industrie pharmaceutique puisque les molécules produites par fermentation sont la deuxième source de revenus de l'industrie biotechnologique après la brasserie ; les antibiotiques représentent un marché considérable de vingt huit milliards de \$ au niveau mondial [Thomson et *al.* (2004)]. Les enzymes des Streptomycètes sont également très intéressantes en biotechnologie, par exemple la xylose isomérase issue d'un Streptomycète thermophile [Hodgson (2000)].

Le génome des Streptomycètes est composé d'une molécule linéaire d'ADN contenant huit millions de paires de bases ce qui en fait un des plus grands génomes bactériens. Ils possèdent également des plasmides linéaires de très grandes tailles ainsi que, plus classiquement, des plasmides circulaires. Une revue sur la génétique des Streptomycètes a été récemment publiée [Hopwood (1999)]. Par ailleurs, les génomes de *Streptomyces coelicolor* A3(2), souche la plus communément étudiée en laboratoire, et celui de *Streptomyces avermitili*, souche utilisée dans l'industrie, ont été intégralement séquencés [Bentley et *al.* (2002), Ikeda et *al.* (2003)].

### I.B.2. *Streptomyces ambofaciens*

*Streptomyces ambofaciens*, souche productrice de spiramycine [Pinnert-Sindico (1954)], est un actinomycète du genre *Streptomyces*. C'est donc une bactérie Gram+ avec une paroi de type I (isomère LL de l'acide DiAminoPimélique), qui possède 69 à 78% de G+C dans son génome, filamenteuse, strictement aérobie, chimiohétérotrophe, immobile et sporulante [Lounes (1994)].

Cette souche ne nécessite pas de facteurs de croissance (vitamines, acides aminés...) pour la croissance et la production d'antibiotique. En revanche, certains minéraux sont essentiels : chlore, phosphate, carbonate, sodium, magnésium, zinc et cobalt. Par ailleurs, d'autres oligo-éléments jouent un rôle sur la croissance de la bactérie : fer, cuivre et molybdène. Certains oligo-éléments favorisent largement la production d'antibiotiques tandis que d'autres ont un effet sur la proportion des différentes formes de spiramycine produites (I, II ou III). Cette souche peut utiliser diverses sources de carbone : glucides (glucose, mannose, galactose, maltose, dextrines, glycogène et amidon), polyols et huiles [Ninet et Verrier (1960)]. Les acides gras à longue chaîne peuvent servir d'unique source de

carbone uniquement après une phase d'adaptation : culture sur dextrine (30 g.L<sup>-1</sup>) puis sur un mélange dextrine (25 g.L<sup>-1</sup>)/méthyl-oléate (5 g.L<sup>-1</sup>), puis sur un mélange dextrine (15 g.L<sup>-1</sup>)/méthyl-oléate (15 g.L<sup>-1</sup>) et finalement sur méthyl-oléate (30 g.L<sup>-1</sup>). En revanche, elle ne pousse pas sur acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, valine ou isoleucine seuls. La source d'azote peut être de nature minérale (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou organique (thréonine, glutamine, glutamate, asparagine, lysine, isoleucine, valine) [Khaoua (1990)].

La glycolyse, ou voie EMP, est fonctionnelle chez *S.ambofaciens* comme le met en évidence la mesure d'une activité élevée pour la 6-phosphofructokinase et pour l'aldolase. La voie des pentoses-phosphate, ou voie PPP, est également fonctionnelle ce qui est démontrée par l'activité élevée de la glucose-6-phosphate déhydrogénase. Le cycle de Krebs, ou cycle TCA, est fonctionnel ce qui est mis en évidence par l'activité élevée de l'isocitrate déhydrogénase et de la citrate synthase de même que par l'activité respiratoire [Khaoua (1990)]. Le cycle glyoxylique est présent car une activité isocitrate lyase est détectable *in vitro*, en revanche l'absence de croissance sur acétate [Khaoua (1990)] met en doute sa fonctionnalité.

Pour les autres voies de son métabolisme, en l'absence de données expérimentales, les connaissances sont déduites de l'analogie avec les études concernant d'autres souches de *Streptomyces*, répertoriées par Hodgson (2000). L'absence des enzymes clés de la voie d'Entner-Doudoroff a été signalée chez cinq espèces de *Streptomyces* différentes. Par ailleurs, aucun système de transport du glucose de type PTS n'a été identifié dans ce genre. En revanche, la présence d'une glucose-kinase est commune. Chez les *Streptomyces*, la voie anapérotyque identifiée est la formation d'oxaloacétate via la PEP carboxylase [Hodgson (2000)].

### I.B.3. Produits de fermentation

Plusieurs auteurs ont rapporté la sécrétion d'acides organiques en phase exponentielle de croissance, principalement le pyruvate et l' $\alpha$ -cétoglutarate (AKG) [Kannan et Rehacek (1970), Surowitz et Pfister (1985), Madden et *al.* (1996)]. Par ailleurs, les Streptomycètes sont des aérobes obligatoires, ils ne sécrètent pas ou peu de lactate ou d'éthanol qui sont les produits finaux des voies de régénération du

NAD produit lors de la formation d'énergie par phosphorylation du substrat dans le cas de croissance sur glucose en anaérobie. La sécrétion d'acides proviendrait d'un déséquilibre entre la glycolyse et le cycle TCA du à l'impossibilité de stimuler ce dernier lorsque celle-là l'est, en conséquence d'un mode de régulation génétique propre à ces microorganismes. L'acidogenèse serait un moyen de profiter de l'excès de glucose, l'énergie étant obtenue par phosphorylation du substrat et l'excès de pyruvate produit par la glycolyse serait alors excrété pour être éventuellement reconsommé ultérieurement en cas de limitation en carbone [Hodgson (2000)].

#### I.B.4. Réserves intracellulaires

Les Streptomycètes ont la capacité de mettre en réserves plusieurs substances : glycogène, tréhalose, polyhydroxybutyrate (PHB) et lipides neutres [Hodgson (2000)]. Jusqu'à présent, tous les Streptomycètes étudiés accumulaient du tréhalose ; il est synthétisé en milieu de phase exponentielle et sa formation s'accélère en phase stationnaire. Son rôle a été essentiellement étudié dans le cadre du développement morphologique et plus particulièrement dans le processus de germination des spores. Il serait une réserve de carbone et d'énergie ainsi qu'un osmoprotecteur et un protecteur contre la deshydratation. Plusieurs Streptomycètes contiennent par ailleurs du glycogène, en proportion plus faible. Ce polysaccharide serait également une réserve de carbone complémentaire en cas d'épuisement du tréhalose. Le PHB, formé par réduction et polymérisation de l'acétoacétylCoA, est une substance de réserve courante chez les bactéries. Toutefois, il n'a été détecté que chez un petit nombre de *Streptomyces* et en quantité très faible (inférieure à 1mg par g de matière sèche) [Hodgson (2000)].

Olukoshi et Packter (1994) ont montré que des triacylglycérols (lipides neutres ou TAG) sont présents dans quatre souches de *Streptomyces* : *S.lividans*, *S.coelicolor*, *S.griseus* et *S.albus*, en plus des phospholipides membranaires. La synthèse de ces deux types de lipides passe par une voie commune, la dernière étape de formation des TAG catalysée par la DAG-acyltransférase étant spécifique de leur synthèse. Il était précédemment supposé que les bactéries n'accumulaient pas de TAG à l'image d'*E.coli*. Olukoshi et Packter (1994) montrent que la quantité de TAG est négligeable en phase

exponentielle de croissance tandis que celle des phospholipides augmente exponentiellement. En phase stationnaire, il y a arrêt de la synthèse de protéines et de phospholipides. En revanche, la formation des TAG, qui débute au cours de la phase exponentielle, se poursuit jusqu'à la fin de la culture avec un pic d'activité de la DAG-acyltransférase en début de phase stationnaire. Leur proportion dans les lipides passe de 20 à 60% au cours de la phase stationnaire ; ils représentent alors près de 5% de la matière sèche, l'accumulation étant similaire dans les quatre souches considérées. Le transfert du mycélium végétatif en début de phase exponentielle vers un milieu en excès de glucose et limité en azote provoque une légère accumulation de biomasse et la multiplication par quatre de la quantité de TAG accumulée par rapport à une culture non transférée. Le transfert vers un milieu en excès de glucose et carencé en azote provoque une multiplication par cinq de la quantité de TAG accumulée. En revanche, le transfert vers un milieu carencé en carbone ne conduit à aucune accumulation de TAG quelque soit la quantité d'azote présente dans le milieu. Ce résultat montre que les phospholipides ont un rôle structural tandis que l'accumulation des TAG serait un moyen, en parallèle de l'excrétion d'acides [phénomène non considéré par Olukoshi et Packter (1994)], de gérer l'excès de carbone quand la croissance s'arrête ; par ailleurs, l'accumulation dépend de la quantité d'azote disponible dans le milieu. Olukoshi et Packter (1994) n'ont pas détecté de PHB dans les quatre souches considérées, une seule ayant accumulé du glycogène. Les TAG sont reconsommés après l'épuisement du glucose, en parallèle de la production d'antibiotique ; ils formulent l'hypothèse que les TAG sont une source de précurseurs à deux carbones pour la biosynthèse de métabolites secondaires. Par ailleurs, ils notent que l'accumulation des TAG et du glycogène est une spécificité supplémentaire du genre *Streptomyces*, avec la capacité de sporuler et de se différencier, qui le rapproche des cellules eukaryotes.

Peacock et *al.* (2003) ont étudié l'effet de la présence de lipides exogènes lors de la culture de *S.lividans* sur trioléine (mélange d'acides gras saturés, insaturés et poly insaturés de C<sub>14</sub> à C<sub>18</sub>), glucose et sur un mélange des deux. Dans ce dernier cas, lorsque le glucose est épuisé, ils rapportent un pic d'activité lipase et de  $\beta$ -oxydation alors que ces activités étaient nulles en présence de sucre. Dans les deux phases de la culture sur substrat mixte, ils n'ont pas détecté de synthèse *de novo* de lipides sauf celle de certains acides gras inhabituels et minoritaires dont les précurseurs proviennent des squelettes

carbonés des acides aminés branchés (valine, leucine et isoleucine). Le substrat oléique servirait donc de source de lipides cellulaires, pour le stockage de substances de réserves (souligné par l'augmentation de la quantité de TAG qui sont stockés dans des vésicules) et pour la synthèse de la bicouche lipidique membranaire. Peacock et *al.* (2003) notent également qu'il n'y a pas de synthèse d'antibiotique sur glucose seul mais qu'elle a lieu sur substrat mixte. Le substrat lipidique a donc un effet positif sur la régulation de la biosynthèse de métabolite secondaire ; les TAG stockés ne seraient par ailleurs pas utilisés lors de la phase de production. Enfin, Peacock et *al.* (2003) soulignent qu'il reste toujours du substrat résiduel en fin de culture, ce qu'ils expliquent par la conjonction de deux phénomènes : un problème de disponibilité du substrat à cause de la chute de l'activité lipase (peut-être due à la protéolyse) et une chute de l'activité de  $\beta$ -oxydation (peut-être du fait de la baisse d'activité métabolique due à une adaptation insuffisante au substrat lipidique).

## I.C. Le métabolisme secondaire

### I.C.1. Généralités

#### I.C.1.a. Définition et hypothèses sur son origine

Le métabolisme primaire ou central inclue l'ensemble des réactions cataboliques et anaboliques qui conduisent à la formation de biomasse i.e. les réactions qui conduisent à la formation d'énergie et de pouvoir réducteur, ceux-ci étant ensuite utilisés pour former et assembler les monomères en macromolécules constitutives des cellules. De manière générale, le métabolisme secondaire est considéré comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui n'ont ensuite pas de fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire [Hodgson (2000)]. Les Streptomycètes sont connus pour la richesse de leur métabolisme secondaire et ont été largement étudiés du fait de l'importance évidente des métabolites secondaires en biotechnologie : antibiotiques, inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase (ex. acide clavulanique), immunosuppresseurs (ex. agent FK506), antifongiques (ex. nystatine), antiparasitaires (ex. avermectine), herbicides (ex. bialaphos), agent mutagène (ex. streptozocine)... [Hodgson (2000)].



Les gènes impliqués dans la biosynthèse des antibiotiques et dans la résistance à ces mêmes composés sont regroupés dans un cluster et leur expression est finement régulée [Hodgson (2000)]. Il existe deux grands groupes d'hypothèses sur le rôle biologique des métabolites secondaires. Le premier regroupe les hypothèses se ramenant à leur apparition par un processus de sélection naturelle ; entre autres, les antibiotiques joueraient un rôle protecteur lors du processus de différenciation au cours duquel le mycélium primaire se lyse et est cannibalisé par le mycélium aérien, ils serviraient alors à éviter que les produits de la lyse ne soient utilisés par d'autres microorganismes [Hodgson (2000)]. Ces hypothèses soulèvent trois problèmes :

- tous les métabolites secondaires ne sont pas des antibiotiques
- certains *Streptomyces* produisent un grand nombre de métabolites secondaires et certains peu ou aucun
- comment les voies de synthèse longues et complexes de ces composés ont pu évoluer au cours du temps ?

Le second groupe d'hypothèses inclue celles qui considèrent les métabolites secondaires comme de simples métabolites d'overflow dont les rôles biologiques se sont ensuite révélés, ce qui unifie au final ces hypothèses avec les précédentes [Hodgson (2000)]. Ces métabolites seraient en fait davantage utiles au fonctionnement métabolique de la cellule que pour leurs rôles dans le milieu extérieur ; en effet, lorsque la croissance est perturbée ("unbalanced growth") à cause, par exemple, d'une carence en une source nutritionnelle majeure, le métabolisme secondaire pourrait être induit pour ralentir les voies du métabolisme primaire dans l'attente que le milieu soit réapprovisionné en cette source. Les voies du métabolisme central fournissent en effet les précurseurs qui alimentent les voies de biosynthèse des métabolites secondaires [Hodgson (2000)].

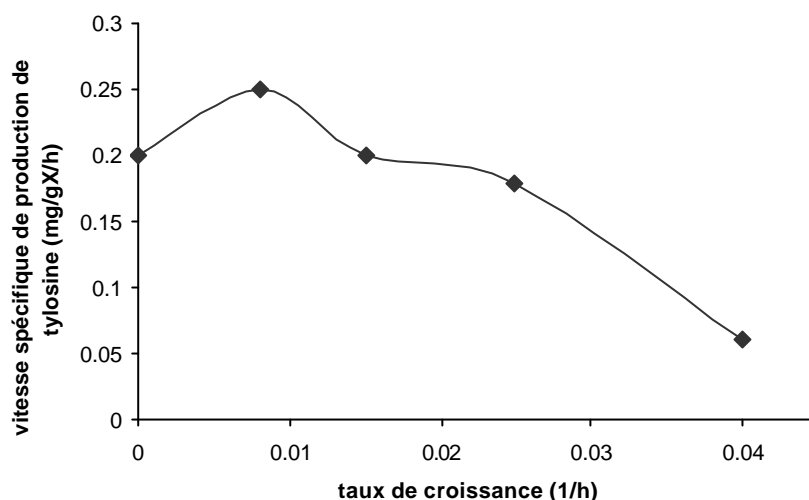
Les métabolites secondaires sont habituellement produits à faibles taux de croissance, ce qui suppose des contrôles régulatoires globaux. Les voies du métabolisme secondaire sont également affectées par des phénomènes d'induction, de régulation à la fois catabolique et par le produit final. Le métabolisme secondaire serait donc soumis à deux niveaux de contrôle [Martin et Demain (1980)].

#### I.C.1.b. Occurrence en fermentation

En culture batch sur milieu riche, les concentrations en antibiotiques les plus élevées sont atteintes en phase stationnaire quand l'essentiel de la croissance est terminé [Martin et Demain (1980)]. La séparation entre phase exponentielle de croissance et phase stationnaire n'est pas toujours claire dans le cas des cultures de microorganismes filamenteux. La Matière Sèche (M.S.) continue en effet à augmenter significativement en phase stationnaire même si cela se produit à un taux plus faible. Toutefois, la mesure de M.S. n'est pas un critère fiable de mesure de la croissance cellulaire effective. La masse de la cellule consiste en effet en la masse des macromolécules nécessaires à sa réplication, mais également en les réserves dont la nature a été détaillée au paragraphe I.B.4. La croissance de la M.S. mesurée après carence ou limitation nutritionnelle est une croissance non répliquative résultant de l'accumulation des polymères de réserves [Martin et Demain (1980)]. La fin de la phase de division cellulaire peut être repérée en ligne par une chute significative de l'activité respiratoire. Dans de nombreuses fermentations où une production d'antibiotiques a lieu, la séparation entre la phase de croissance vraie et la phase stationnaire est marquée sur des milieux riches capables d'assurer une croissance rapide. En revanche, ces deux phases sont partiellement superposées lors de cultures sur milieux synthétiques n'assurant qu'une croissance lente. Dans ce cas, un facteur nutritionnel peut être limitant depuis le tout début de la culture, provoquant l'induction des voies secondaires alors qu'une croissance lente a lieu. Le facteur provoquant le début de la biosynthèse d'antibiotique, selon le deuxième groupe d'hypothèses précité, est la disparition d'un ou plusieurs nutriments ; ceci a pour conséquence l'arrêt de la croissance répliquative et la transition vers la phase stationnaire [Martin et Demain (1980)].

Une limitation nutritionnelle imposant un taux de croissance suffisamment faible semble suffisante pour induire la biosynthèse d'antibiotique. La production de tylosine a été étudiée en culture batch sur milieu glucose – glutamate – méthyl-oléate, avec une transition peu marquée entre la phase de croissance et la phase stationnaire, ainsi qu'en chemostat à des taux de dilution compris entre  $0,008 \text{ h}^{-1}$  et  $0,04 \text{ h}^{-1}$  [Vu-Trong et Gray (1982)]. La structure de cet antibiotique présente une grande

similarité avec celle de la spiramycine ; il apparaît que la vitesse spécifique de production d'antibiotique est une fonction affine décroissante du taux dilution (cf. figure n°I.C.1.b.1)



**Fig. I.C.1.b1 évolution de la vitesse spécifique de production de tylosine en fonction du taux de croissance [Vu-Trong et Gray (1982)]**

L'ordonnée à l'origine est extrapolée à partir de la valeur de vitesse mesurée en milieu de phase stationnaire de la culture batch alors que le taux de croissance est nul. Une correction est à prendre en compte car les différentes formes de tylosine mesurées ne sont pas les mêmes entre la culture batch et la culture continue. Cette figure montre qu'il y aurait un optimum de production à un taux de croissance proche de  $0,01 \text{ h}^{-1}$ .

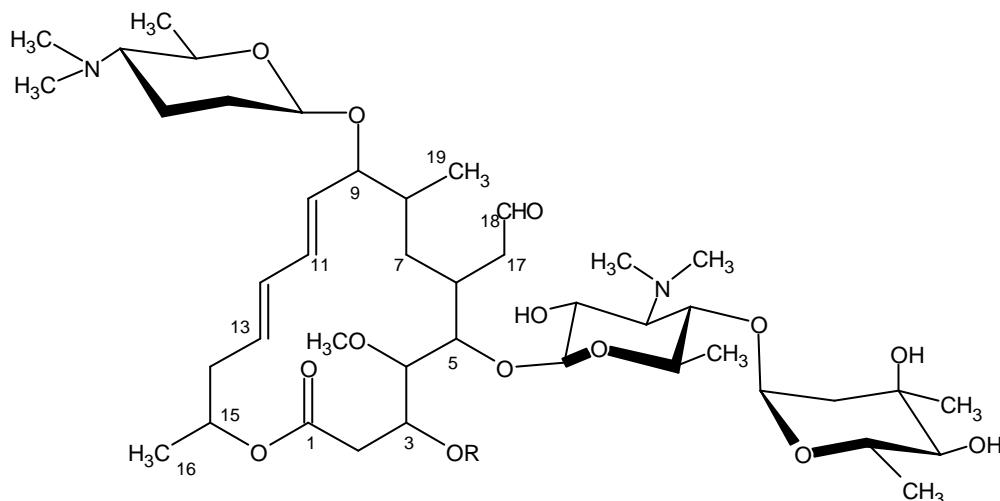
De la même façon, l'acide clavulanique est produit quand l'ammonium ou le phosphate sont limitants pour la croissance. A taux de croissance élevés i.e. supérieurs à  $0,1 \text{ h}^{-1}$ , cet antibiotique n'est pas produit tandis qu'à de faibles taux de croissance i.e. inférieurs à  $0,05 \text{ h}^{-1}$  la biosynthèse a lieu en parallèle de la croissance limitée par l'azote ou le phosphore [Roubos et *al.* (2001)].

Il est à noter que l'induction du métabolisme secondaire prend un temps significatif, sans doute parce que la souche productrice est initialement sensible à son produit [Martin et Demain (1980)]. La résistance doit être acquise lors de l'induction du métabolisme secondaire et il se trouve que les gènes de résistance ainsi que ceux codant pour les enzymes des voies secondaires sont situés dans le même cluster.

## I.C.2. La spiramycine

### I.C.2.a. Structure et voie de biosynthèse

La spiramycine est un antibiotique de la famille des macrolides. Ces derniers sont des molécules lipophiles basiques composés d'un macrocycle lactonique, ou aglycone, sans atome d'azote [Woodward (1957)]. Un à trois 6-déoxyhexoses, dont un est méthylé, sont liés au cycle. Le nombre d'atome du cycle lactonique, ou nombre de membre, divise les macrolides en plusieurs catégories : macrolides à 12, 14, 16, ou 17 membres. L'avant dernière catégorie regroupe la plupart des macrolides, dont la spiramycine (cf. figure n°I.C.2.a.1).



**Fig. I.C.2.a.1** Formule semi-développée de la spiramycine

Ils peuvent également être classés selon la nature des oses et la maturation du cycle [Omura et Nakagawa (1981)] ; dans ce cadre, la spiramycine appartient à la classe de la leucomycine, elle est caractérisée par la présence d'une fonction aldéhyde extra-nucléaire sur le carbone 18 et d'un mycaroside de mycaminose en position 5 [Asselineau et Zalta (1973)]. L'aglycone possède une structure spécifique entre les carbones 9 et 13. Il existe trois types de spiramycine suivant le groupement porté par le carbone n°3 du cycle (cf. figure n°I.C.2.a.1) :

- Spiramycine I : R = H
- Spiramycine II : R = COCH<sub>3</sub>
- Spiramycine III : R = COC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

Les précurseurs de la spiramycine proviennent tous des voies du métabolisme central ; le catabolisme de la valine a été mis en évidence comme une source importante mais non exclusive de précurseurs [Tang et *al.* (1994)]. L'ensemble des informations sur la voie de synthèse de la spiramycine est résumé sur la figure n°I.C.2.a.2 dans laquelle les principaux métabolites échangés avec le milieu extérieur lors de la culture sur le milieu salin défini lors de cet étude apparaissent en gras ; cette figure met en évidence les nombreux liens entre le métabolisme central de la bactérie et les voies secondaires.

La synthèse de l'aglycone, dont la structure possède une grande similarité avec celui de la leucomycine, requiert huit précurseurs activés sous forme d'acylCoA pour sa biosynthèse : un acétylCoA, quatre malonylCoA, un méthyl-malonylCoA, un éthyl-malonylCoA et un méthoxy-malonylCoA [Omura et *al.* (1977), Blondelet-Rouault et *al.*(2004)]. Trois sucres, le mycaminose, la forosamine et le mycarose sont greffés sur le macrocycle pour former le macrolide [Omura et *al.* (1979)].

Le malonylCoA est synthétisé de deux manières différentes [Lounes (1994)] :

- carboxylation de l'acétylCoA catalysé par l'acétylCoA carboxylase  $Mg^{2+}$  et ATP dépendante
- décarboxylation oxydative de l'oxaloacétate produit à partir du phosphoénolpyruvate par la PEP carboxylase

Le méthyl-malonylCoA est issue de plusieurs voies :

- catabolisme de la valine [Navarette et *al.* (1990)]
- carboxylation du propionate : soit catalysée par une carboxylase ATP dépendante, soit catalysée par une méthyl-malonylCoA carboxyltransférase, avec transformation concomitante d'oxaloacétate en pyruvate. Une corrélation existe entre l'activité de ces deux enzymes et la production de tylosine [Vu-Trong et Gray (1982), (1986)]
- isomérisation du succinate issu du cycle des acides tricarboxyliques ou du cycle glyoxylique, catalysée par une méthyl-malonylCoA mutase. Cette voie est suggérée pour la synthèse de la leucomycine [Omura (1976)]

L'éthylmalonylCoA pourrait être issu de la conversion du butyrate, ce qui a été signalé pour certaines espèces productrices de macrolides à 16 membres [Omura et Nakagawa (1981)]. Le propionate et le

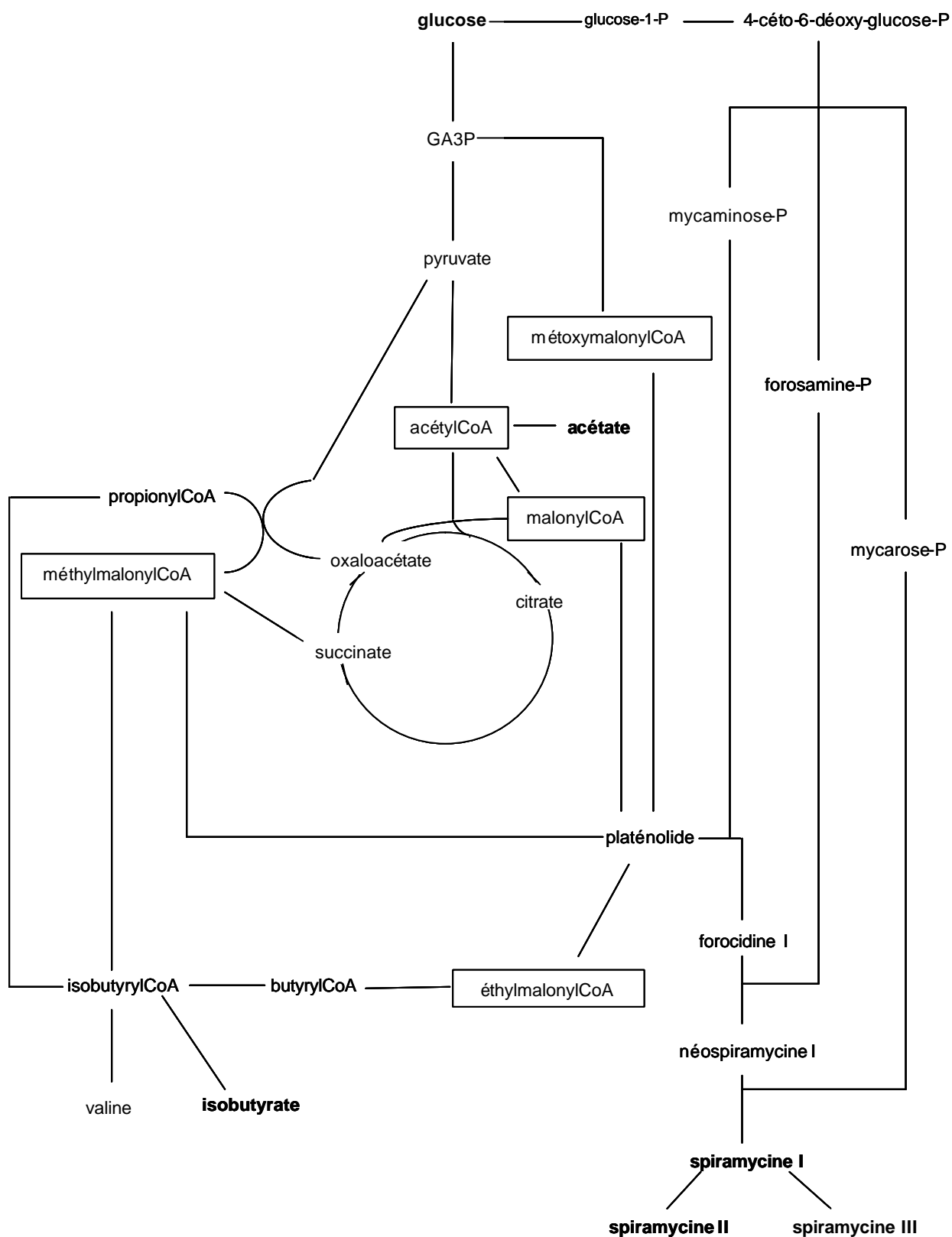


Fig. I.C.2.a.2 Voie de biosynthèse de la spiramycine

butyrate peuvent provenir de la dégradation incomplète des acides gras à nombres respectivement impair et pair de carbone [Lounes (1994)].

Le métoxy-malonylCoA est un précurseur inhabituel pour les polykétides et il n'a été identifié que récemment. Sa voie de synthèse n'est pas entièrement identifiée, il proviendrait d'un intermédiaire glycolytique à trois carbones comme par exemple le glycéraldéhyde-3-phosphate [Wu et *al.* (2000)].

Les sucres greffés sur l'aglycone sont synthétisés à partir du glucose-1-phosphate via un intermédiaire commun, le 4-céto-6-déoxyglucose [Bate et *al.* (2000)].

#### I.C.2.b. Régulation de la production

##### I.C.2.b.1. Sources carbonées

L'étude de la production de spiramycine avec la valine comme source d'azote montre que le taux de croissance est plus élevé selon que la source de carbone est le glucose ( $0,075 \text{ h}^{-1}$ ) ou les dextrines ( $0,04 \text{ h}^{-1}$ ). La vitesse spécifique de production d'antibiotique ( $v_{\text{spira}}$ ) varie de manière inverse, étant respectivement égale à  $0,2 \text{ mg.g}_x.\text{h}^{-1}$  et  $0,4 \text{ mg.g}_x.\text{h}^{-1}$  [Lounes et *al.* (1996)]. La croissance étant particulièrement lente sur glucose et le milieu utilisé étant fortement carencé, il est probable que la croissance soit limitée dès le début de la culture et que les voies du métabolisme secondaire soient induites lors de la phase de croissance. Toujours est-il que les dextrines sont une source de carbone lentement assimilable qui impose une limitation supplémentaire en carbone. L'ajout de 5 à  $60 \text{ g.L}^{-1}$  de glucose en phase stationnaire provoque l'accumulation de glucose dans le milieu et une diminution de  $v_{\text{spira}}$  de 0,3 à  $0,05 \text{ mg.g}_x.\text{h}^{-1}$ . Le glucose a donc un effet inhibiteur sur la production de spiramycine, effet dans lequel interviendrait la phosphorylation du sucre [Lounes et *al.* (1996)].

Une étude similaire comparant l'effet des dextrines à celui du glycérol aboutit à des résultats semblables. Le taux de croissance est plus élevé sur glycérol ( $0,07 \text{ h}^{-1}$ ) que sur dextrines ( $0,03 \text{ h}^{-1}$ ) tandis que  $v_{\text{spira}}$  varie en sens inverse (respectivement 0,05 et  $0,35 \text{ mg.g}_x.\text{h}^{-1}$  pour chaque source de carbone) ; par ailleurs, dans le cas de l'étude sur dextrines, respectivement près de 1 et  $4 \text{ g.L}^{-1}$  d'acétate et d'isobutyrate sont accumulés au cours de la culture puis reconsommés l'un après l'autre. L'ajout de 5 à  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de glycérol en début de culture conduit à une diminution de  $v_{\text{spira}}$  de 0,3 à 0

mg.g<sub>x</sub>.h<sup>-1</sup>. Cette étude montre également que le glycérol exerce un effet à la fois inhibiteur et répresseur sur certains systèmes enzymatiques participant au métabolisme secondaire [Lounes et *al.* (1995)].

Il apparaît donc que la présence de substrat résiduel rapidement assimilable dans le milieu de culture inhibe la production de spiramycine. Il semble de ce fait nécessaire d'assurer une croissance équilibrée ("balanced growth") et de séparer nettement la phase de croissance de la phase stationnaire lorsqu'on souhaite produire la spiramycine sur des sources carbonées simples.

#### I.C.2.b.2. Sources azotées et phosphate

L'étude de la production de spiramycine avec différentes sources d'azote (ammonium, valine ou isoleucine) et les dextrines comme source de carbone montre que  $v_{\text{spira}}$  varie de 0,08 à 0,27 mg.g<sub>x</sub>.h<sup>-1</sup>, la vitesse la plus faible étant mesurée sur ammonium et la plus élevée sur isoleucine. Par ailleurs, sur dextrines et ammonium,  $v_{\text{spira}}$  varie de 0,15 à 0,03 mg.g<sub>x</sub>.h<sup>-1</sup> avec l'augmentation de la concentration résiduelle en ions. Cette étude montre également que les ions ammonium ont un effet à la fois inhibiteur et répresseur sur certains systèmes enzymatiques participant au métabolisme secondaire [Lebrihi et *al.* (1992)]. L'utilisation de nitrates permet de s'affranchir des effets négatifs pré-cités, cependant ils limitent fortement la croissance et le rendement en biomasse est près de deux fois plus faible par rapport aux autres sources d'azote. Par ailleurs, la production de spiramycine est légèrement inférieure sur nitrates par rapport à une culture limitée en ammonium [Untrau et *al.* (1994)].

L'étude de la production de spiramycine sur milieu dextrines – valine avec des concentrations résiduelles en phosphate croissantes de 0 à 30 mM montre que  $v_{\text{spira}}$  décroît de 0,3 à 0,07 mg.g<sub>x</sub>.h<sup>-1</sup>. Par ailleurs, la production d'antibiotique est totalement inhibée lorsque la concentration résiduelle est proche de 90 mM mais un pulse de 100 mM de phosphate après le début de la biosynthèse n'a pas d'effet. L'inhibition de la phosphatase alcaline, dont l'activité élevée est corrélée à une phase intense de production d'antibiotique, est présentée comme une explication possible de l'effet des phosphates [Lounes et *al.* (1996)]. Toutefois, aucun intermédiaire phosphorylé n'intervient dans la biosynthèse de la spiramycine, contrairement au cas de la streptomycine [Martin et Demain (1980)].



### I.C.2.b.3. Acides gras à courtes et longues chaînes

L'étude de la biosynthèse de spiramycine sur milieu dextrines – ammonium montre que des pulses réguliers d'un mélange d'acides gras volatils ( $C_2$  à  $C_4$ ) en phase stationnaire permet d'augmenter  $v_{\text{spira}}$  de 0,18 à 0,4  $\text{mg.g}_x.\text{h}^{-1}$ , le meilleur résultat étant obtenu avec un mélange d'acétate et de butyrate. Par ailleurs, l'effet négatif d'une concentration résiduelle élevée en ions ammonium peut être partiellement compensé par un ajout de ces acides,  $v_{\text{spira}}$  passant alors de 0,05 à 0,13  $\text{mg.g}_x.\text{h}^{-1}$ . La présence d'acides gras à courtes chaînes aurait un effet stimulateur sur les acyl-transférases qui sont les enzymes qui permettent d'activer les précurseurs de la spiramycine [Khaoua et al. (1992)].

Schauner et al. (1999) ont étudié le rôle des lipides intracellulaires lors de la production de spiramycine en comparant des souches mutées. Chez *S.ambofaciens*, certaines caractéristiques facultatives du métabolisme secondaire (pigmentation, formation d'un mycélium aérien sur milieu solide, production d'antibiotique...) sont génétiquement instables. Cette instabilité a été généralement caractérisée par des délétions chromosomiques souvent associées à de grandes amplifications de séquences ADN aux extrémités des chromosomes. Ainsi les auteurs ont-ils étudiés la souche parentale, Sp181110 (qui est la souche utilisée dans cette thèse, notée "Spi"), la souche NSA205 (notée "Spi<sup>-</sup>") qui possède une amplification instable ne contenant pas le cluster des gènes de biosynthèse et qui est non productrice de spiramycine sur milieu riche, et la souche NSA228 (notée "Spi<sup>+</sup>") issue de la précédente, productrice de spiramycine, qui a perdu la séquence amplifiée. Cette dernière contient une ORF dont le produit est une polykétide synthase dont le mécanisme d'action est proche des enzymes impliquées dans la synthèse des lipides. La culture de ces trois souches sur milieu synthétique met en évidence des profils de croissance et de production d'antibiotique très différents. Les trois souches forment toutefois le même co-produit, l'acétate, de manière similaire. La souche Spi<sup>-</sup> excrète des ions ammonium plus précocement et en quantité plus importante par rapport aux autres souches (10 mM contre 3 mM). La vitesse spécifique de production d'antibiotique ( $v_{\text{spira}}$ ) est similaire pour les souches Spi et Spi<sup>-</sup>, respectivement 0,4 et 0,3  $\text{mg.g}_x.\text{h}^{-1}$ , mais la phase de production est beaucoup plus courte pour la souche Spi<sup>-</sup>.  $v_{\text{spira}}$  est quatre fois plus élevée pour la souche Spi<sup>+</sup>.

L'analyse des lipides intracellulaires de ces trois souches au cours des cultures montre que le pourcentage de lipides dans la biomasse augmente tout au long de la culture pour les souches Spi et Spi<sup>+</sup> (pour atteindre respectivement 15 et 10% en fin de culture). Il augmente uniquement pendant la phase de croissance pour la souche Spi<sup>-</sup> pour atteindre 7,5% puis diminue jusqu'à 3% en fin de culture. L'analyse de la quantité de phospholipides montre qu'elle augmente au cours de la phase de croissance pour les trois souches puis reste constante en phase stationnaire pour les souches Spi et Spi<sup>+</sup>. En revanche, elle diminue pendant cette phase pour la souche Spi<sup>-</sup> en parallèle de la décroissance de la Matière Sèche (M.S.) qui serait alors peut être liée à une perte de l'intégrité cellulaire. L'analyse de la quantité de triacylglycérols (TAG) montre qu'elle augmente tout au long de la culture, leur synthèse s'accroissant au cours de la phase exponentielle pour les souches Spi et Spi<sup>+</sup>, en accord avec les résultats d'Olukoshi et Packter (1994). La synthèse des TAG pour la souche Spi<sup>-</sup> s'accroît également au cours de la phase de croissance mais s'arrête en début de phase stationnaire et leur quantité diminue jusqu'à zéro en fin de culture. L'analyse de la composition des lipides en acides gras ne met pas en évidence la présence d'acides gras anormaux potentiellement toxiques pour la cellule. Contrairement aux deux autres souches, la souche Spi<sup>-</sup> produit un pigment en quantité importante. Les auteurs formulent l'hypothèse que les précurseurs de la spiramycine sont détournés vers la production de ce pigment pour expliquer la très faible production par cette souche, sans toutefois avoir pu doser ledit composé. Elle pourrait également s'expliquer par la quantité très faible de TAG mis en réserves si l'on considère les hypothèses d'Olukoshi et Packter (1994). Etant donné que les souches Spi et Spi<sup>+</sup> présentent des profils lipidiques similaires et que la souche Spi<sup>+</sup> a un potentiel de production quatre fois plus élevé que la souche Spi, le seul rôle des lipides n'est pas suffisant pour expliquer le niveau de production. Toutefois, une faible production d'antibiotique pourrait s'expliquer par une quantité de réserves lipidiques, notamment de TAG, insuffisante dans la souche productrice.

#### I.C.2.b.4. Rôle des oligo-éléments

Weinberg (1978) indique que la biosynthèse des métabolites secondaires a une tolérance beaucoup plus faible à la gamme de concentration en phosphate et en oligo-éléments (numéros atomiques 23 à

30 et 42 i.e. V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn et Mo) que la croissance végétative des cellules productrices. Les éléments les plus couramment étudiés sont Zn, Fe, Cu et Mn, ils auraient une influence sur la proportion des différents types d'antibiotiques produits [cf. Ninet et Verrier (1960) pour la spiramycine] voire sur la nature des familles produites dans le cas de souches multi-productrices. Ces éléments ont probablement des cibles multiples dans les systèmes impliqués dans la biosynthèse de ces métabolites, systèmes synthétisés relativement tôt en début de phase stationnaire. Les précédentes études concernant *S.ambofaciens* ont été réalisées sur des milieux synthétiques pauvres en oligo-éléments, ne contenant uniquement que du zinc et du cobalt, et ne présentent pas de données concernant leur influence.

#### I.C.2.b.5. Rôle de la morphologie

Pons et *al.* (1998) ont étudié les phénomènes liés à la différenciation des cellules dans les filaments (amincissement des filaments, septation, lyse) lors de la culture de *S.ambofaciens* sur milieu industriel complexe (amidon, corn steep, huile de maïs, sulfate d'ammonium). Il apparaît que la longueur moyenne des filaments et la vitesse d'allongement augmente en phase exponentielle. Cette vitesse diminue à la fin de cette phase lorsque le taux de croissance diminue, ce qui est dû à la formation de nombreux branchements. La lyse cellulaire débute dès la fin de la phase de croissance, aux extrémités puis à l'intérieur des filaments et se poursuit jusqu'en fin de culture. L'activité respiratoire, estimée par un colorant, semble homogène entre les extrémités et l'intérieur des filaments ; l'amincissement de ces derniers se fait progressivement après la limitation de la croissance, exclusivement à leurs extrémités, et se poursuit jusqu'à la fin de la culture. Enfin, la septation apparaît dès le début de la phase exponentielle pour atteindre son maximum lorsque la production d'antibiotique s'achève. Il semblerait alors que la fragmentation des filaments soit un des phénomènes provoquant ou étant lié à l'arrêt de la biosynthèse de la spiramycine.

## Chapitre II Matériel & méthodes

### II.A. Souche et milieux de culture

#### II.A.1. Souche

Le micro-organisme utilisé est *Streptomyces ambofaciens* Sp 181110 (Sanofi-Aventis, Vitry sur Seine), souche productrice du macrolide spiramycine.

#### II.A.2. Milieux de culture

Quatre milieux de culture sont utilisés :

- Milieu riche :

Extrait de levure	5 g.L <sup>-1</sup>
Tryptone	10 g.L <sup>-1</sup>
Glucose	5 g.L <sup>-1</sup>
NaCl	9 g.L <sup>-1</sup>

- Milieu de pré-culture :

Glucose	10 g.L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g.L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g.L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	1 g.L <sup>-1</sup>
NaCl	0,1 g.L <sup>-1</sup>
CaCO <sub>3</sub>	5 g.L <sup>-1</sup>
Solution concentrée de fer	0,5 mL.L <sup>-1</sup>
Solution concentrée d'oligo-éléments	0,3 mL.L <sup>-1</sup>

*Solution de fer :*

FeSO <sub>4</sub>	30 g.L <sup>-1</sup>
-------------------	----------------------

*Solution d'oligo-éléments :*

$\text{CuSO}_4$	$3,9 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4$	$4,4 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4$	$7,5 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{NaMoO}_4$	$0,5 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{CoCl}_2$	$1 \text{ g.L}^{-1}$
KI	$0,33 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{AlCl}_3$	$0,4 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{HBO}_3$	$0,2 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{NiCl}_2$	$0,5 \text{ g.L}^{-1}$

▪ Milieu de culture Batch :

Glucose	$40 \text{ g.L}^{-1}$
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$6 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$1,5 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{MgSO}_4$	$0,5 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2$	$0,03 \text{ g.L}^{-1}$
NaCl	$0,15 \text{ g.L}^{-1}$
Solution concentrée de fer	$1,5 \text{ mL.L}^{-1}$
Solution concentrée d'oligo-éléments	$0,9 \text{ mL.L}^{-1}$

▪ Milieu de culture Fed-batch :

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$7,2 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$1,8 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{MgSO}_4$	$0,6 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2$	$0,036 \text{ g.L}^{-1}$
NaCl	$0,18 \text{ g.L}^{-1}$
Solution concentrée de fer	$1,8 \text{ mL.L}^{-1}$
Solution concentrée d'oligo-éléments	$1,1 \text{ mL.L}^{-1}$

Les milieux de pré-culture et de culture Batch ont été calculés selon l'approche de Egli & Fiechter (1981). Les facteurs d'excès ( Fe ) ont été calculés par rapport à la biomasse qui peut être formée à partir du carbone présent initialement. Les rendements de formation de biomasse à partir de chaque élément sont déduits des données disponibles pour *E.coli*.

**Tab. II.A.2.1 facteurs d'excès calculés pour le milieu de pré-culture (A) et le milieu de culture Batch (B)**

( A )

élément	Fe
Aluminium	1,96558814
Azote	1,10064141
Bore	1,15079851
Calcium	1305,9782
Carbone	1,00017786
Chlore	8,48120924
Cobalt	1,46929612
Cuivre	5,88755157
Fer	3,99191848
Hydrogène	non-calculé
Iode	3,02199272
Magnésium	8,38495606
Manganèse	2,89148837
Molybdène	1,15334171
Nickel	1,8716228
Oxygène	non-calculé
Phosphore	6,31753532
Potassium	1,68983512
Sodium	3,38453541
Soufre	8,72691184
Zinc	1,18676692

( B )

élément	Fe
Aluminium	1,69549309
Azote	0,63293351
Bore	0,99266519
Calcium	2,03183503
Carbone	1,00028167
Chlore	4,43723988
Cobalt	1,26739746
Cuivre	5,07853237
Fer	3,44338168
Hydrogène	non-calculé
Iode	2,60673519
Magnésium	1,20546066
Manganèse	2,49416368
Molybdène	0,99485892
Nickel	1,61443969
Oxygène	non-calculé
Phosphore	3,88583197
Potassium	1,45763179
Sodium	1,460800541
Soufre	1,37076552
Zinc	1,02369111

Le tableau II.A.2.1 (A) présente le calcul des facteurs d'excès pour le milieu de pré-culture. Il est théoriquement possible de former 4,5 g.L<sup>-1</sup> de biomasse à partir du glucose présent initialement ; le tableau II.A.2.1 (A) montre que tous les autres éléments sont en excès donc qu'il n'y aura théoriquement pas de carence ou de limitation nutritionnelle jusqu'à l'épuisement du glucose. Par ailleurs, le calcium est en large excès à cause de la présence d'une quantité largement excédentaire de CaCO<sub>3</sub> qui est généralement utilisée pour tenter de limiter la décroissance du pH lors des cultures en fioles.

Le tableau II.A.2.1 (B) présente le calcul des facteurs d'excès pour le milieu de culture Batch. Il est théoriquement possible de former 16 g.L<sup>-1</sup> de biomasse à partir du glucose présent initialement ; le tableau II.A.2.1 (B) montre que le facteur d'excès pour l'azote est nettement inférieur à 1 alors que tous les autres sont supérieurs à 0,99. L'azote est donc l'élément limitant de la croissance qui va

s'arrêter théoriquement alors que la concentration en biomasse est égale à  $10,3 \text{ g.L}^{-1}$  à l'épuisement des ions ammonium.

Le milieu de culture Fed-batch est identique au milieu de culture Batch sauf que les sels sont concentrés d'un facteur 1,2.

## II.B. Conditions de culture

### II.B.1. Pré-cultures

Les pré-cultures sont réalisées en deux étapes à partir de Mycélium Végétatif Congelé (MVC) conservé dans un cryotube à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

1. Prélèvement de 0,1 mL de MVC pourensemencer un tube contenant 5 mL de milieu riche. Cette opération est réalisée en triple. Les tubes sont incubés 24 h à  $30^{\circ}\text{C}$  et 170 rpm sur table agitante.
2. Transvasement du contenu de trois tubes dans un erlenmeyer bafflé contenant 400 mL de milieu de pré-culture. L'erlenmeyer est incubé 16 h à  $28^{\circ}\text{C}$  et 120 rpm sur table agitante.

Ces opérations sont réalisées en triple pour obtenir un volume final d'inoculum de 1,2 L.

### II.B.2. Cultures en fermenteur de 20 litres

Les cultures sont réalisées dans un fermenteur BRAUN (modèle Biostat E, BRAUN DIESSEL BIOTECH. Melsungen, Allemagne), équipé de modules de mesure et régulation de la température, du pH (sonde FERMPROBE BROADLEY-JAMES Co., Santa Ana, USA), de l'oxygène dissous (sonde INGOLD, Urdorf, Suisse) et de la pression (cf. figure II.B.2.1 page suivante). Le fermenteur est connecté à un ordinateur de type PC par une interface Analogique / Digital – Digital / Analogique et une connexion de type RS 232. Le module d'entrée-sortie permet l'acquisition en ligne des données des capteurs (vitesse d'agitation, température, pH, oxygène dissous, pression), du temps de fonctionnement des pompes de liquides régulateurs de pH et d'antimousse ainsi que la commande des pompes d'alimentation en substrat, tandis que la liaison asynchrone reliant la balance (modèle I 12000 S, SARTORIUS, Goettingen, Allemagne) à l'ordinateur permet la lecture en ligne de la masse du

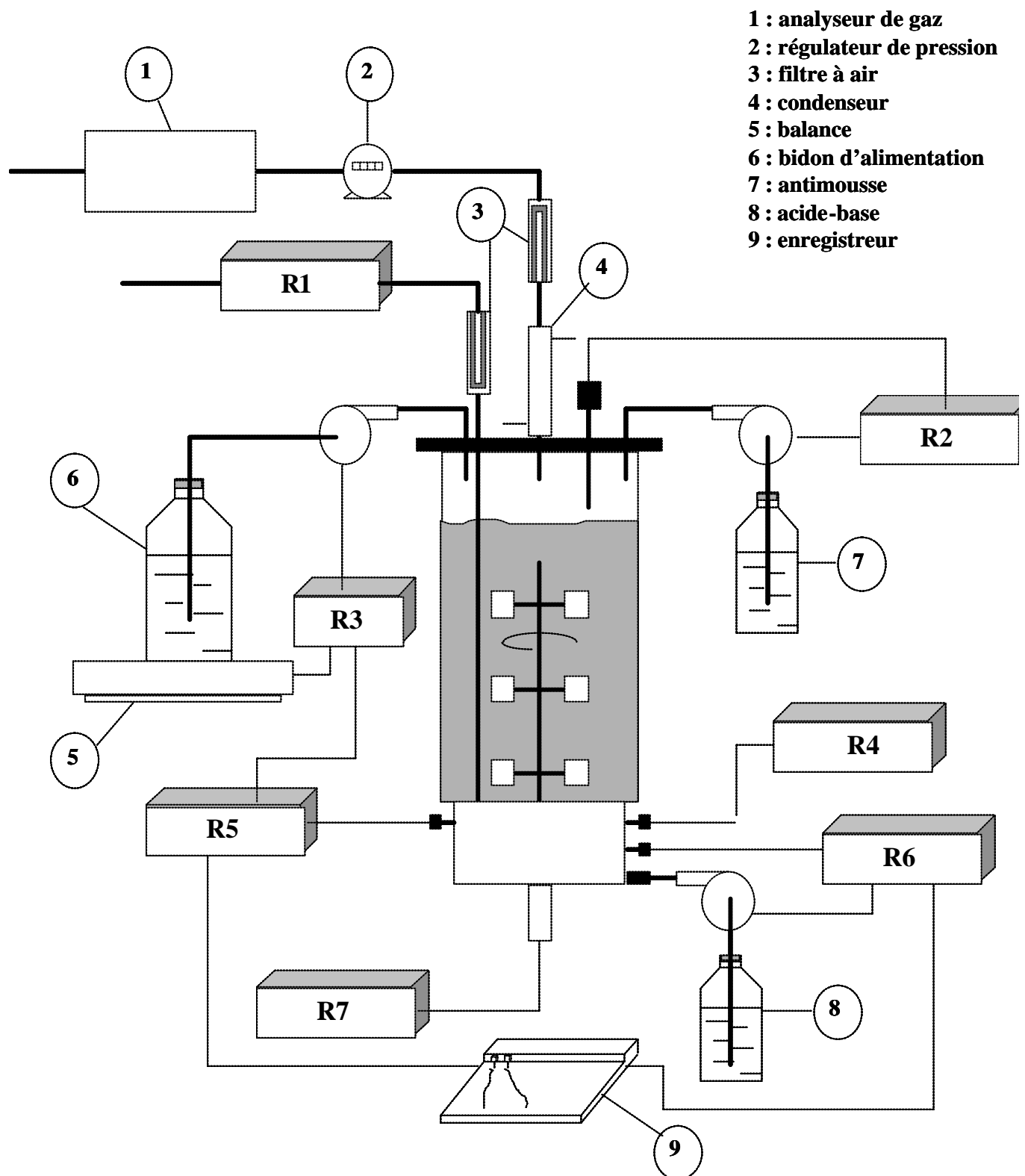


Fig. II.B.2.1 schéma du pilote de fermentation



réservoir contenant la solution de substrat envoyée dans le fermenteur. Ainsi la quantité de sucre envoyée dans le fermenteur est-elle estimée en temps réel.

Le programme de gestion de l'alimentation du réacteur en substrat a été développé au laboratoire par P.Perlot (Béghin Say) et J.-L. Uribelarrea (INSA). Ce logiciel écrit en Turbo Pascal présente les fonctions suivantes : mesure, filtrage et stockage des données, calcul des variables indirectes, contrôle et représentations graphiques. Ce logiciel permet en particulier :

- une estimation du taux de croissance à partir de la mesure de la quantité de base ajoutée pour réguler le pH.
- une estimation du taux de croissance à partir de la mesure de la  $pO_2$ , à taux de transfert d'oxygène constant (agitation, aération et pression constantes).

Ce programme permet également de faire des calculs d'analyse de gaz à partir des pourcentages d' $O_2$ , de  $CO_2$ , d' $N_2$  et d'Ar dans les gaz d'entrée et de sortie, mesurés en ligne par un spectromètre de masse relié au PC par une deuxième liaison RS 232. Il est ainsi possible de calculer en ligne la vitesse de consommation d' $O_2$ , de production de  $CO_2$ , le coefficient respiratoire et d'avoir une estimation du taux de croissance à partir de la vitesse de production de  $CO_2$ .

Le milieu contenant les sels est stérilisé dans le fermenteur à 120°C pendant 20 minutes. La solution de calcium et de magnésium est stérilisée séparément en autoclave à 120°C pendant 20 minutes, puis est transvasée dans le fermenteur par piquage stérile. Les solutions de fer et d'oligo-éléments sont ajoutées stérilement à la seringue. Le glucose est préparé séparément en solution concentrée à environ 400 g.L<sup>-1</sup> et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. L'alimentation en substrat carboné est assurée par une pompe péristaltique commandée par le logiciel.

Le pH est régulé à 7.0 par addition d'une solution concentrée de potasse (5N) ou d'acide phosphorique (5N) et la température est régulée à 28°C.

## II.C. Définition des conduites Fed-batch

A partir de l'analyse des cultures Batch, la stratégie de conduite n°1 a été définie de manière à reproduire les différentes phases observées en batch (cf. ci-dessous) sans accumuler de co-produits acides :

- phase exponentielle de croissance jusqu'à l'épuisement de la source d'azote
- phase linéaire de croissance jusqu'à l'épuisement du glucose
- phase stationnaire avec reconsommation des co-produits accumulés dans les précédentes phases

En situation de croissance non limitée, la bactérie pousse à  $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$  et produit de l'acétate. En excès de glucose et limitation d'azote, la bactérie produit du pyruvate et de l' $\alpha$ -cétooglutarate. En carences de glucose et d'azote, la bactérie reconsomme ces trois acides.

La conduite fed-batch n°1 est la suivante :

- phase exponentielle de croissance en limitation de glucose à  $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$  de manière à minimiser l'accumulation d'acétate
- phase linéaire de croissance en limitation de glucose après carence en azote. Le débit constant maximum de glucose permettant la croissance linéaire tout en minimisant la production d'acides organiques a été déterminé empiriquement. Il est noté  $\Phi_{\text{lgp}}$  et est fonction de la masse de glucose consommé à l'épuisement de la source d'azote, notée  $M_N$  :

$$\Phi_{\text{lgp}}(M_N) = 2,52 \times 10^{-2} \times M_N$$

Cet apport impose une division par 5 du taux de croissance à la transition entre les 2 phases de croissance par rapport au taux de croissance maximal observé sur le milieu défini lors de cette étude ( $0,15 \text{ h}^{-1}$ ).

Par ailleurs, cette phase dure 14 heures de manière à former 35% de biomasse supplémentaire en phase linéaire (proportion observée lors de la culture Batch de référence). La biomasse formée est déduite de la masse de glucose apportée de manière limitante, en supposant que le

rendement moyen de formation de biomasse à partir du glucose est constant sur l'ensemble de la phase de croissance.

- phase stationnaire en limitation de glucose et carence d'azote suite aux 14 heures de phase linéaire de croissance. L'apport constant et limitant de glucose pendant la phase stationnaire représente la consommation d'une quantité de carbone identique à la reconsommation des acides observée lors de la culture Batch de référence. Il a été calculé par réconciliation des données (cf. 2.4.9.1), est noté  $\Phi_{sp}$  et est fonction de la masse totale de glucose consommée lors de la croissance (phase exponentielle + phase linéaire) notée  $M_{xm}$  :

$$\Phi_{sp}(M_{xm}) = 9,8 \times 10^{-3} \times M_{xm}$$

Cette stratégie de conduite permet de reproduire les différentes phases des cultures Batch en utilisant le glucose comme unique source de carbone exogène.

Dans le but de doubler la concentration en biomasse en fin de croissance linéaire à partir du même état initial, la stratégie de conduite n°2 a été définie.

La conduite Fed-batch n°2 est la suivante :

- La 1<sup>ère</sup> phase est identique à celle de la conduite n°1 ; cependant le pH est régulé par l'ammoniaque durant les 24 premières heures de fermentation qui correspondent à la durée moyenne de la phase exponentielle lors des autres cultures Fed-batch, de manière à conserver une concentration en ions ammonium relativement constante dans le fermenteur.

Ensuite le pH est régulé par la potasse de manière à épuiser l'azote présent initialement. Lors du changement de liquide correcteur de pH, un pulse de solutions concentrées en fer et en oligo-éléments représentant des quantités identiques à celles présentes initialement est effectué de manière à compenser l'épuisement du milieu initial. Dans le même temps, une solution de sels est apportée pour éviter d'éventuelles carences nutritionnelles autres que l'épuisement de la source d'azote. Sa composition (cf. ci-dessous) est calculée de manière à satisfaire les besoins nutritionnels de la souche au cours de la croissance exponentielle à  $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$  et à ce que le débit d'apport soit égal au dixième du débit de glucose.

Composition de la solution de sels apportée :

MgSO <sub>4</sub>	19,35 g.L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	0,4 g.L <sup>-1</sup>
NaCl	10 g.L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11,36 g.L <sup>-1</sup>
KCl	12,48 g.L <sup>-1</sup>
MgCl	4,58 g.L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10,13 g.L <sup>-1</sup>

- Lorsque la carence en azote a lieu, la phase linéaire est conduite de la même manière que pour la stratégie de conduite n°1.
- De même, 14 heures après la carence nutritionnelle, la phase stationnaire est conduite de manière identique par rapport à la stratégie de conduite n°1.

## II.D. Techniques analytiques

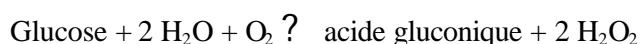
### II.D.1. Biomasse

Après filtration d'un volume connu d'échantillon (4 à 20 mL) sur membrane de porosité 0,45 µm préalablement séchée et pesée, la membrane est rincée par une solution d'acide chlorhydrique 100mM, séchée à l'étuve sous vide (200 mm Hg, 60°C) pendant 24 heures et enfin pesée. La concentration en masse sèche est déterminée par différence des deux pesées et réajustement par rapport au volume filtré.

### II.D.2. Glucose

#### II.D.2.a. YSI

Au cours de la culture, le glucose résiduel est dosé à l'aide d'un analyseur automatique Y.S.I. modèle 2000 (YELLOW SPRING INSTRUMENT Inc., Yellow Spring, Ohio, USA). Le principe de ce dosage est basé sur la libération de peroxyde d'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) lors de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase immobilisée sur une membrane.



L'oxydation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par une électrode de platine libère un flux d'électrons. Le courant ainsi créé est proportionnel à la concentration en glucose. Après étalonnage de l'appareil, le résultat est directement délivré en  $\text{g.L}^{-1}$ .

Les échantillons à doser doivent être exempts de cellules (centrifugation) et dilués de sorte que la concentration en glucose soit inférieure ou égale à  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ .

#### II.D.2.b. D.N.S.

Après la culture, les échantillons prélevés sont dosés par la méthode de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) [Miller (1959)].

**Préparation du réactif :** dissoudre 300 g de tartrate double de sodium et potassium et 16 g de NaOH dans un peu d'eau distillée. Ajouter progressivement 10 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique et compléter à 1 L avec de l'eau distillée. Il peut être nécessaire de chauffer la solution pour dissoudre complètement le DNS.

**Méthode de dosage :** 200  $\mu\text{L}$  de réactif sont ajoutés à 200  $\mu\text{L}$  de surnageant préalablement dilué. Le mélange est porté à ébullition pendant 5 minutes au bain-marie. Après refroidissement dans la glace, 2 mL d'eau distillée sont ajoutés. Un temps de 15 minutes est nécessaire pour que l'échantillon se stabilise à température ambiante. La lecture spectrophotométrique est réalisée à 500 nm contre un blanc composé de 200  $\mu\text{L}$  de réactif et 200  $\mu\text{L}$  d'eau distillée. La gamme étalon est comprise entre 0 et  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  de glucose.

#### II.D.3. Ammonium

Au cours de la culture, la concentration en ions ammonium est dosée à l'aide d'une électrode (ORION RESEARCH, Boston, USA). Le dosage consiste à transformer les ions ammonium en ammoniacque en milieu alcalin. Le gaz ainsi formé pénètre dans l'électrode en passant à travers une membrane en Téflon. Il s'établit alors une différence de potentiel entre les ions  $\text{OH}^-$  (libérés par la réaction de l'ammoniacque avec l'électrolyte) et l'électrode. Il existe une relation linéaire entre le logarithme décimal de la concentration en ammonium et la différence de potentiel mesurée.

La sonde est plongée dans 5 mL d'échantillon agité mélangé à 200  $\mu$ L de tampon ISA (ORION RESEARCH, Boston, USA) de manière à ce que le pH du mélange soit compris entre 11 et 14. La gamme étalon est comprise entre  $10^{-1}$  et  $10^{-4}$  M d' $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

#### II.D.4. Phosphate

Après la culture, les échantillons prélevés sont dosés par la méthode utilisant le molybdate d'ammonium.

**Préparation du réactif :** solution A : 6,4mL d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  95% dans 50 mL d'eau distillée  
solution B : 0,6 g de molybdate d'ammonium dans 12,5 mL d'eau distillée  
solution C : 0,0146 g de tartrate double de potassium et d'antimoine dans 5mL d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N

Les solutions B et C sont ajoutées à la solution A puis le volume est ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée. 2 g d'acide ascorbique sont ajoutés et le mélange se colore en jaune. Le mélange ne se conserve pas plus d'un jour.

**Méthode de dosage :** 4 mL d'étalon ou d'échantillon sont mélangés à 0,8 mL de réactif. Le mélange est agité vigoureusement puis est laissé reposer 15 minutes. La lecture spectrophotométrique est réalisée à 720 nm contre un blanc composé de 4 mL d'eau distillée et 0,8 mL de réactif. La gamme étalon est comprise entre 0 et 5  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

#### II.D.5. Acides organiques volatils

Les produits volatils de fermentation (acides gras à courtes chaînes : acétate, propionate, isobutyrate et butyrate) sont dosés par chromatographie en phase gazeuse sur un chromatographe (HP 5890, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA) équipé d'une colonne semi-capillaire (30 m x 0,32 mm, SupelQ-plot, Supelco). L'appareil est muni d'un détecteur à ionisation de flamme couplé à un intégrateur (HP3396-A) qui calcule l'aire des pics. L'azote est utilisé comme gaz vecteur à une pression de 40 kPa en tête de colonne. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont égales à 250°C. La température du four est programmée de la façon suivante :

$140^\circ\text{C} \xrightarrow{8^\circ\text{C.mn}^{-1}} 166^\circ\text{C pendant 7 mn} \xrightarrow{32^\circ\text{C.mn}^{-1}} 235^\circ\text{C pendant 10 mn}$

Les échantillons sont dosés en présence d'un étalon interne (2-méthyl-propan-1-ol, 20 g.L<sup>-1</sup> dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5N) ajouté au surnageant de culture dans la proportion de 1 volume d'étalon interne pour 4 volumes de surnageant. La calibration est effectuée à l'aide de solutions étalons de concentrations connues.

Pour certains échantillons, l'acidification due à l'ajout d'étalon interne entraîne la formation d'un dépôt blanchâtre qui rend le mélange inhomogène et fausse le dosage. Afin de minimiser la formation de ce dépôt, les protéines présentes dans le surnageant sont précipitées par la méthode suivante :

600 µL d'échantillon sont mélangés avec 200 µL de ZnSO<sub>4</sub> 0,3M et 200 µL de Ba(OH)<sub>2</sub> 0,2M. Le mélange est agité vigoureusement puis centrifugé 20 mn à 13000 rpm. Le surnageant est prélevé et analysé de la manière décrite ci-dessus. Les concentrations en acides sont corrigées de manière à tenir compte du facteur de dilution du à cette défécation.

#### II.D.6. Acides organiques non volatils

Les acides organiques non volatils formés au cours de la culture (pyruvate et α-cétoglutarate) sont dosés par chromatographie en phase liquide (HPLC) en utilisant un chromatographe (Alliance, modèle Waters 2690) équipé d'une colonne H<sup>+</sup> échangeuse d'ions (Aminex HPX-87-H, Biorad, USA). Les échantillons sont élués par une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM dont le débit est fixé à 0,5 mL.mn<sup>-1</sup>. La température est régulée à 50°C. Les acides sont détectés à 210 nm (détecteur PDA Alliance, modèle Waters 996) et l'intégration des pics est effectuée par le logiciel Millenium.

#### II.D.7. Spiramycines

Les trois formes de la spiramycine (I, II et III) formées au cours de la culture sont dosées par chromatographie en phase liquide (HPLC) en utilisant un chromatographe (Waters 600<sup>E</sup>) équipé d'une colonne nucléosyl 100-5-C8 (4,6 mm x 250 mm, particules de 5 µm de diamètre, Bischoff chromatography, Leonberg, Royaume-Uni). Les échantillons sont élués par un mélange tampon phosphate (pH 7) – acétonitrile (70 :30 [v/v]) ; 6,25 g/L de perchlorate de sodium sont rajoutés à ce mélange. Le débit de travail est fixé à 1 mL.mn<sup>-1</sup> et la température à 40°C. Les trois formes de

l'antibiotique sont détectées à 238 nm et l'intégration des pics est effectuée par le logiciel Millenium. La concentration en antibiotique considérée est la somme des concentrations de chacune des formes de spiramycine (I + II + III).

## II.D.8. Gaz de fermentation

### II.D.8.a. Détermination des fractions molaires

Les gaz de fermentation en entrée et sortie du fermenteur sont analysés par un spectromètre de masse (PRIMA 600S, VG gas, Manchester, Royaume-Uni). Les molécules sont ionisées par bombardement électronique puis séparées en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique. Les fractions molaires de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> et Ar sont déterminées avec une précision relative de 0,1%. La mesure de la composition des gaz de sortie est effectuée toutes les trois minutes ; l'air en entrée du fermenteur est analysé toutes les heures.

### II.D.8.b. Calcul des vitesses de production de CO<sub>2</sub> et de consommation d'O<sub>2</sub>

Dans un premier temps, le débit de gaz en sortie du fermenteur est déterminé en faisant un bilan sur les gaz inertes, argon et azote :

$$Q^{out} = Q^{in} \cdot (\%Ar^{in} + \%N_2^{in}) / (\%Ar^{out} + \%N_2^{out})$$

$Q^{in}$  et  $Q^{out}$  sont les débits de gaz en entrée (in, mesuré par un débitmètre massique) et sortie (out) du fermenteur ; ils sont exprimés en L.h<sup>-1</sup>.  $\%Ar^{in}$ ,  $\%N_2^{in}$ ,  $\%Ar^{out}$ ,  $\%N_2^{out}$  sont les fractions molaires de l'Argon (Ar) et de l'azote (N<sub>2</sub>) dans les gaz en entrée (in) et sortie (out) du fermenteur.

Les vitesses de production de CO<sub>2</sub> ( $r_{CO_2}$ ) et de consommation d'O<sub>2</sub> ( $r_{O_2}$ ) exprimées en mole.h<sup>-1</sup> sont calculées de la façon suivante :

$$r_{O_2} \cdot V_{LB} = Q^{in} y_{O_2}^{in} - Q^{out} y_{O_2}^{out} - \frac{d(V_{gas} \cdot y_{O_2}^{out})}{dt} - \frac{d(V_{LB} \cdot x_{O_2}^B)}{dt}$$

$$r_{CO_2} \cdot V_{LB} = Q^{in} y_{CO_2}^{in} - Q^{out} y_{CO_2}^{out} - \frac{d(V_{gas} \cdot y_{CO_2}^{out})}{dt} - \frac{d(V_{LB} \cdot x_{CO_2}^B)}{dt}$$



$V_{LB}$  est le volume liquide dans le fermenteur,  $V_{gas}$  est le volume du ciel gazeux.  $y_{O_2}$  et  $y_{CO_2}$  sont les pressions partielles en  $O_2$  et  $CO_2$  en phase gaz ;  $x_{O_2}$  et  $x_{CO_2}$  sont les concentrations en  $O_2$  et  $CO_2$  dans le milieu à l'équilibre.

Ces égalités restent vraies quelque soit le taux d'humidité des gaz en sortie du fermenteur puisque  $H_2O$  n'interfère pas avec la mesure du spectromètre de masse.

Le coefficient respiratoire (QR) représente la valeur absolue du rapport  $r_{CO_2} / r_{O_2}$

#### II.D.8.c. Correction des données gaz

La dilution due au ciel gazeux et l'acheminement des gaz de sortie jusqu'au spectromètre de masse introduisent une distorsion sur la mesure de composition des gaz et donc sur le calcul des vitesses de respiration. L'hypothèse retenue est que les gaz sont infiniment mélangés, une loi de diffusion rapide est alors introduite.

#### II.D.8.d. Calcul du coefficient de transfert d'oxygène $k_L a$

$K_L a$  est calculé en ligne à partir d'un bilan matière sur l'oxygène gazeux :

$$K_L a = \frac{1}{V_{LB} \times (x_{O_2}^* - x_{O_2})} \left( Q^{in} y_{O_2}^{in} - Q^{out} y_{O_2}^{out} - \frac{d(V_{gas} \cdot y_{O_2}^{out})}{dt} \right)$$

$V_{LB}$  est le volume liquide dans le fermenteur.  $V_{gas}$  est le volume du ciel gazeux.

$x_{O_2}^*$  est la concentration de l'oxygène dissous dans le milieu à l'équilibre avec la pression partielle en oxygène en phase gaz,  $y_{O_2}^B$ , selon la loi de Henry :  $x_{O_2}^* \times H = P \times y_{O_2}^B$

H est la constante de Henry.

$x_{O_2}$  peut être relié à la pression partielle en oxygène dissous selon :  $x_{O_2} = x_{O_2}^* \times \frac{p_{O_2}}{100}$

Le flux de gaz sec en sortie,  $Q_{out}$ , est calculé à partir du flux sec entrant de la même manière que pour le calcul des vitesses de respiration.

Dans l'établissement du bilan dynamique, les concentrations gazeuses ainsi que leurs dérivées sont corrigées en supposant que le ciel gazeux est infiniment mélangé.

Le système étudié est caractérisé par des flux de transfert rapides. La phase gazeuse à travers le réacteur est donc hétérogène. Ces hétérogénéités sont prises en compte par les hypothèses ci-dessous. Les deux premières sont souvent utilisées dans la littérature, la dernière est originale.

**Hypothèse n°1** : la phase gazeuse s'écoule en régime piston. Le gradient de concentration en oxygène est donc calculé par une moyenne logarithmique entre l'entrée et la sortie de la phase dispersée :

$$< x_{O_2}^* - x_{O_2} >_{\ln} = \frac{(y_{O_2}^{in} - y_{O_2}^B) - (y_{O_2}^{out} - y_{O_2}^B)}{\ln \left( \frac{y_{O_2}^{in} - y_{O_2}^B}{y_{O_2}^{out} - y_{O_2}^B} \right)} \cdot \frac{P}{H}$$

**Hypothèse n°2** : la phase liquide est parfaitement mélangée. Les hétérogénéités axiales sont ignorées,  $K_L a$  est un coefficient global.

**Hypothèse n°3** : le  $CO_2$  nucléé à côté des bulles d'air; il n'y a pas coalescence entre les bulles de  $CO_2$  ainsi formées et les bulles d'air; le  $CO_2$  ne diffuse pas dans les bulles d'air :

$$y_{O_2}^{out} = \frac{y_{O_2}^{offgas}}{y_{O_2}^{offgas} + y_{N_2}^{offgas} + y_{Ar}^{offgas}}$$

## II.D.9. Traitement des données expérimentales

### II.D.9.a. Lissage et réconciliation des données

Les courbes lissées sont obtenues par interpolation des points expérimentaux par des polynômes sur une fenêtre glissante. Ce lissage permet d'obtenir une continuité de la valeur lissée et de sa dérivée.

Les courbes lissées sont analysées par une méthode développée au laboratoire [Cailler (1994)] dérivée des méthodes décrites par van der Heijden *et al.* [Heijden *et al.* (1994a), Heijden *et al.* (1994b)] pour la détection d'erreur et l'ajustement de données. Cette méthode permet l'ajustement des vitesses de réaction dans leur globalité. Les calculs se font à partir de la matrice élémentaire construite sur l'ensemble des variables d'état définissant le système, du vecteur des vitesses de réaction mesurées et de la matrice de variance associée à ces mesures. On obtient des valeurs qui permettent d'équilibrer les bilans sur les quatre éléments pris en compte : carbone, hydrogène, oxygène et azote. Pour chaque point expérimental, la meilleure estimation des flux de réaction est calculée sur la base d'une

vérification des bilans élémentaires sur les vitesses de réaction. Cette estimation est effectuée par minimisation d'un critère d'erreur sur l'ensemble des mesures ou par élimination d'une mesure si le système est surdimensionné. Les variables d'état sont recalculées par intégration des vitesses de réaction estimée, ce traitement permet de ce fait la vérification de la cohérence des données expérimentales.

#### II.D.9.b. Interpolation des points expérimentaux

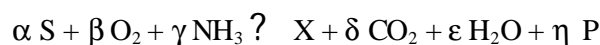
Le micro-organisme étudié étant une bactérie filamenteuse, il apparaît que la détermination de la concentration en biomasse est biaisée par l'inhomogénéité du moût de fermentation. Ceci est particulièrement important lors des phases de croissance linéaire et stationnaire lorsque l'accumulation de biomasse est faible. On observe alors une dispersion très forte des points expérimentaux et le lissage des données ne donne pas de résultats satisfaisants.

Dans ce cas, les données sont interpolées par une courbe de tendance linéaire ou puissance en minimisant les écarts entre les valeurs expérimentales et la courbe de tendance par la méthode des moindres carrés : pour un point donné, l'erreur  $\varepsilon$  est égale à  $\frac{(X_m - X_i) \times (X_m - X_i)}{X_m}$  où  $X_m$  est la

valeur mesurée et  $X_i$  est la valeur interpolée. Ensuite la valeur  $\sum_k e_k$  est minimisée en faisant varier les coefficients de la courbe d'interpolation.

#### II.D.9.c. Bilans carbone et redox

La réaction biologique peut être écrite d'une façon générale de la manière suivante :



Où S est le substrat, X la biomasse et P les autres produits.

Le bilan carbone est défini par :  $\sum_i F_i = 0$  où  $F_i$  est le flux en C mole pour le composé i. On obtient

donc :

$$\Phi_S + \Phi_X + \Phi_{CO_2} + \Phi_P = 0$$

Le bilan redox est défini par :  $\sum_i g_i \cdot F_i = 0$  où  $g_i$  est le degré de réduction du composé i. En posant :

- $\gamma_{\text{NH}_3} = 3 \lambda_{\text{H}} + \lambda_{\text{N}} = 0$
- $\gamma_{\text{CO}_2} = 2 \lambda_{\text{O}} + \lambda_{\text{C}} = 0$
- $\gamma_{\text{H}_2\text{O}} = 2 \lambda_{\text{H}} + \lambda_{\text{O}} = 0$
- $\lambda_{\text{H}} = 1$

On obtient :  $\lambda_{\text{N}} = -3$  ;  $\lambda_{\text{C}} = 4$  et  $\lambda_{\text{O}} = -2$ . D'où :

$$\gamma_{\text{S}} \cdot \Phi_{\text{S}} - 4 \cdot \Phi_{\text{O}_2} + \gamma_{\text{X}} \cdot \Phi_{\text{X}} + \gamma_{\text{P}} \cdot \Phi_{\text{P}} = 0$$

## II.D.10. Analyse des flux métaboliques

### II.D.10.a. Généralités sur le type de modèle utilisé

Le système cellulaire est représenté par l'ensemble des réactions biochimiques du métabolisme étudié. On considère non seulement les composés échangeables avec l'extérieur, mais aussi les composés intra-cellulaires : intermédiaires métaboliques, équivalents réducteurs, ATP... ce qui fait de ce type de modèle un "descripteur métabolique". Les réactions à considérer sont les réactions anaboliques (voies de biosynthèse des composés formant la biomasse), les réactions cataboliques (voies impliquées dans le métabolisme énergétique), le transport et, éventuellement, différentes voies de dissipation d'énergie (ATPase, motilité, travail, etc.).

### II.D.10.b. Formulation et écriture mathématique [Bideaux (2000)]

#### récapitulatif des notions mathématiques utilisées

$r_i$  : vitesse nette de réaction (mole/g<sub>x</sub>/h)

$a_i$  : coefficient stœchiométrique (adimensionnel)

$F_A$  : flux d'échange de A (mole/g<sub>x</sub>/h)

$a$  : concentration de A (mole/g<sub>x</sub>)

$\mu$  : taux de croissance (h<sup>-1</sup>)

$R_i$  : vitesse nette de conversion (mole/g<sub>x</sub>/h)

$S$  : matrice stœchiométrique

**r** : vecteur des vitesses nettes de réaction

**R** : vecteur des vitesses nettes de conversion

**A** : matrice **S** augmentée

**b** : vecteur **r** augmenté

**y** : base vectorielle du noyau de **A**

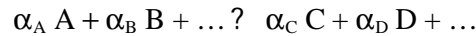
**C** : coordonnées de **b** dans **y**

**b<sub>p</sub>** : vecteur des vitesses fixées pour résoudre le système

**y<sub>p</sub>** : matrice extraite de **y**

**n<sub>y</sub>** : dimension de **y**

Chaque réaction stoechiométrique peut être décrite par une équation de la forme :



sa vitesse  $r_i$  est positive pour le sens d'écriture, les termes de gauche étant alors les métabolites consommés et les termes de droite les métabolites produits. Les lettres grecques sont les coefficients stoechiométriques attribués aux métabolites dans la réaction. Ainsi pour la  $i^{\text{ème}}$  réaction, A est consommé avec une vitesse  $-a_{Ai} r_i$  et C est produit avec une vitesse  $a_{Ci} r_i$ . Dans la cellule, un métabolite A est consommé par  $k$  réactions et produit par  $p$  réactions. Les  $l$  réactions anaboliques sont intégrées dans le terme de consommation de métabolites. Les coefficients stoechiométriques de ces réactions sont numériquement indéterminés car variables suivant les conditions de culture, ils seront donc représentés par des variables symboliques. Un bilan matière (accumulation = consommation + production + transport) pour chaque composé au niveau de la cellule s'écrit :

$$\frac{d(a.X)}{dt} = \sum_{i=1}^{k+l} -a_i r_i X + \sum_{j=1}^p a_j r_j X + \Phi_A X$$

$$a \frac{dX}{dt} + X \frac{da}{dt} = \sum_{i=1}^{k+l} -a_i r_i X + \sum_{j=1}^p a_j r_j X + \Phi_A X$$

$$\frac{da}{dt} = \sum_{i=1}^{k+l} -a_i r_i + \sum_{j=1}^p a_j r_j + \Phi_A - \frac{a}{X} \frac{dX}{dt}$$

$$\frac{da}{dt} = \sum_{i=1}^{k+l} -a_i r_i + \sum_{j=1}^p a_j r_j + \Phi_A - m \times a$$

où  $a$  est la concentration de A en mole par gramme de biomasse,  $\Phi_A$  le flux d'échange de A avec le milieu extérieur, et  $a_i / a_j$  les coefficients stœchiométriques de A dans les réactions considérées. Les vitesses de réactions  $r_i / r_j$  sont exprimées en mole par gramme de biomasse et par heure.

#### II.D.10.c. Hypothèses simplificatrices

Les constantes de temps caractérisant les transitions métaboliques ( $< 10^{-4}$  s) sont très faibles comparées aux constantes de temps de la croissance cellulaire et de la dynamique des procédés biotechnologiques (10 à  $10^4$  s). Il est généralement admis qu'il y a un taux de renouvellement très élevé pour la plupart des pools de métabolites. En conséquence, les concentrations des différents pools s'ajustent rapidement à leurs nouvelles valeurs même après une perturbation importante de l'environnement cellulaire. Il est de ce fait raisonnable de penser que les concentrations des différents métabolites sont à l'état quasi stationnaire. Le bilan massique ci-dessus peut donc être simplifié en ne considérant que le régime permanent, c'est-à-dire que l'accumulation des métabolites intracellulaires

est supposée nulle, soit :  $\frac{da}{dt} = 0$

Le terme  $\mu \cdot a$  est un terme de dilution lié à la croissance cellulaire. La concentration intracellulaire de chaque intermédiaire métabolique étant très faible, l'effet de dilution dans la biomasse est faible particulièrement par rapport aux autres flux affectant le métabolite considéré. Ce terme peut généralement être négligé lorsque le temps caractéristique de turnover du pool est très petit devant le

temps caractéristique de la croissance  $\left( \frac{1}{m} \right)$  ce qui est généralement le cas sinon il peut être inclus

dans des réactions artificielles de consommation [Reardon et al. (1987)]. On obtient alors l'équation suivante :

$$-\Phi_A = \sum_{i=1}^{k+l} -a_i r_i + \sum_{j=1}^p a_j r_j$$

On pose pour les coefficients  $\alpha$  la convention suivante :

- $a$  est négatif quand **A** est consommé
- $a$  est positif quand **A** est produit
- $a$  est nul quand **A** n'apparaît pas dans la réaction considérée

l'équation précédente s'écrit alors :  $-\Phi_A = \sum_{i=1}^n a_i r_i$

Le flux d'échange  $F_A$  est positif quand le métabolite **A** entre dans la biomasse et est négatif quand il est excrété vers le milieu extérieur. Or d'après les conventions traditionnellement utilisées dans un réacteur, la vitesse nette de conversion d'un métabolite **A**,  $R_A$ , est positive quand **A** est produit (donc excrété par la cellule vers le milieu extérieur) et est négative quand **A** est consommé (donc quand il entre dans la cellule). D'où  $R_A = -F_A$ , et l'équation ci-dessus devient :

$$R_A = \sum_{i=1}^n a_i r_i$$

#### II.D.10.d. Généralisation

Cette équation, qui permet de calculer la vitesse nette de conversion  $R_A$  d'un métabolite, est une équation linéaire dont les coefficients sont les  $a_i$  et les inconnues les vitesses réactionnelles  $r_i$ . Une telle équation peut être écrite pour tous les métabolites pris en compte dans le modèle ; si on considère **n** réactions faisant intervenir **m** métabolites dont **k** sont échangés avec l'extérieur, le système des **m** équations linéaires obtenues, qui représente le schéma métabolique, peut se mettre sous la forme matricielle suivante :

$$\begin{bmatrix} s_{11} & - & - & - & - & - & s_{1n} \\ | & & & & & & | \\ | & & & & & & | \\ | & & & & & & | \\ | & & & & & & | \\ s_{m1} & - & - & - & - & - & s_{mn} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} r_1 \\ | \\ | \\ | \\ | \\ | \\ r_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} R_{x1} \\ | \\ R_{xk} \\ | \\ 0 \\ | \\ 0 \end{bmatrix}$$

soit  $\mathbf{S.r = R}$

avec **S** la matrice stœchiométrique dont chaque colonne correspond à une des réactions métaboliques répertoriées et chaque ligne à un métabolite. Le coefficient  $s_{ij}$  représente donc le coefficient stœchiométrique attribué au métabolite  $i$  dans la réaction  $j$ . **r** est le vecteur-colonne des vitesses nettes de réaction, et **R** le vecteur-colonne des vitesses nettes de conversion pour chaque métabolite.

#### II.D.10.e. Résolution du système d'équations de flux

Le système linéaire d'équation de flux est typiquement sous-déterminé ; en effet, les inconnues sont les vitesses réactionnelles  $r_j$  et les vitesses d'échange avec le milieu extérieur  $R_i$  pour les métabolites extracellulaires. Comme le nombre de métabolites est supérieur au nombre de réactions, le nombre d'inconnues ( $n + k$ ) est supérieur au nombre d'équations (**m**). Le système possède donc une infinité de solution or nous cherchons à déterminer l'unique distribution de flux qui correspond à l'activité métabolique de la cellule dans les conditions de culture mises en œuvre, à partir des mesures disponibles en ligne sur le réacteur ; ce but ne pourra être atteint que si des vitesses,  $r_j$  et/ou  $R_j$ , sont fixées de façon à lever l'indétermination du système. Il peut être réécrit de la manière suivante, en augmentant la matrice **S** et le vecteur **r** des vitesses réactionnelles :

$$\begin{bmatrix} s_{11} & - & - & s_{1n} & -1 & - & 0 \\ | & & & | & | & & | \\ | & & & | & 0 & - & -1 \\ | & & & | & | & & | \\ s_{m1} & - & - & s_{mn} & 0 & - & 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} r_1 \\ | \\ | \\ r_n \\ R_{x1} \\ | \\ R_{xk} \end{bmatrix} = 0$$

si on appelle **A** et **b** les matrices obtenues, le système devient :

$$\mathbf{A} \cdot \mathbf{b} = 0$$

**b** appartient donc au noyau de **A**. Si **y** est une base du noyau **A**, **b** peut s'écrire comme une unique combinaison linéaire des vecteurs de **y** :  $\mathbf{b} = \mathbf{y} \cdot \mathbf{C}$  où **C** est le vecteur-colonne des coordonnées de **b** dans **y**.



Le système matriciel s'écrit alors :

$$\begin{array}{c} m \\ \boxed{\begin{array}{c} n+k \\ A \end{array}} \end{array} \times \begin{array}{c} n+k \\ \boxed{\begin{array}{c} n_y \\ y \end{array}} \end{array} \times \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\begin{array}{c} C \end{array}} \end{array} = 0$$

Avec  $n_y$  le nombre de colonnes de  $y$ . Les inconnues du système  $\mathbf{b} = \mathbf{y} \cdot \mathbf{C}$  sont les  $n+k$  éléments de  $\mathbf{b}$  et les  $n_y$  éléments de  $\mathbf{C}$ , or on dispose de  $n+k$  équations donc le nombre d'inconnues à fixer est :  $n+k+n_y - (n+k) = n_y$ ; cela revient au même de constater que le système est résolu dès qu'on connaît les  $n_y$  éléments de  $\mathbf{C}$ .

Une fois les  $n_y$  vitesses fixées, on peut extraire un vecteur  $\mathbf{b}_p$  de  $\mathbf{b}$  dont les composantes sont les vitesses choisies afin de résoudre le système. Les  $n_y$  équations correspondantes sont extraites du système global, et on obtient alors le système suivant :

$$\begin{array}{c} n_y \\ \boxed{\begin{array}{c} y_p \end{array}} \end{array} \times \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\begin{array}{c} C \end{array}} \end{array} = \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\begin{array}{c} b_p \end{array}} \end{array}$$

Sa résolution permet de connaître le vecteur  $\mathbf{C}$ , donc  $\mathbf{b}$ , et de résoudre le système d'équation de flux. Pour obtenir une solution unique, il faut que la matrice  $\mathbf{y}_p$  soit inversible, c'est à dire de rang plein ( $\text{rang}(\mathbf{y}_p) = n_y$ ), ce qui implique que les vitesses fixées ne doivent pas être redondantes : elles doivent former une famille libre, sinon une des colonnes au moins de  $\mathbf{y}_p$  pourra s'exprimer comme une combinaison linéaire des autres, et le rang de  $\mathbf{y}_p$  sera strictement inférieur à  $n_y$ . Si on a fixé des vitesses non redondantes, le système est dit de Cramer ; on peut le résoudre soit en inversant  $\mathbf{y}_p$ , soit en utilisant les formules de Cramer (basées sur le calcul de déterminants). De cette façon,  $\mathbf{C}$  s'exprime avec les coordonnées de  $\mathbf{b}_p$  ( $\mathbf{C} = \mathbf{y}_p^{-1} \cdot \mathbf{b}_p$ ) donc en fonction des vitesses fixées. Puis on obtient  $\mathbf{b} = \mathbf{y} \cdot \mathbf{C}$  ; de ce fait, toutes les vitesses réactionnelles et les vitesses de conversion sont connues en fonction des vitesses fixées :  $\mathbf{b} = \mathbf{y} \cdot \mathbf{y}_p^{-1} \cdot \mathbf{b}_p$ .

Le code de calcul utilisé pour mettre en œuvre cette méthode de résolution présente l'avantage de faire du calcul symbolique. Ainsi certaines grandeurs du système, coefficients stœchiométriques des

réactions de synthèse de la biomasse, vitesses intra/extracellulaires inconnues et vitesses intra/extracellulaires fixées, sont considérés comme des variables symboliques donc l'unique solution du système apparaît également sous cette forme. Par la suite, il est possible d'attribuer des valeurs numériques à ces variables de manière à calculer une expression numérique pour la distribution de flux.

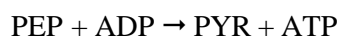
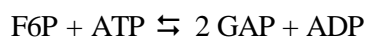
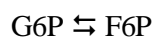
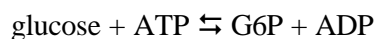
## Chapitre III Construction du modèle

### III.A. Réseau métabolique

#### III.A.1. Métabolisme central

Le métabolisme central de la bactérie est représenté par les principales voies cataboliques et anaboliques. Les données stoechiométriques sont issues de la base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), en utilisant *S.coelicolor* comme microorganisme de référence.

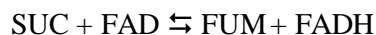
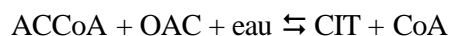
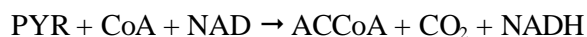
##### III.A.1.a. La glycolyse



Abréviations utilisées :

<b>F6P</b>	Fructose-6-P	<b>GAP</b>	glyceraldehyde-3-phosphate	<b>PG</b>	3-phosphoglycérate
<b>G6P</b>	glucose-6-P	<b>PEP</b>	phosphoénolpyruvate	<b>PYR</b>	pyruvate

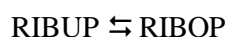
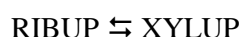
##### III.A.1.b. Le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) et la voie anaplérotique



Abréviations utilisées :

<b>ACCoA</b>	acetyl-CoenzymeA	<b>CoA</b>	CoenzymeA	<b>PYR</b>	pyruvate
<b>AKG</b>	$\alpha$ -cétooglutarate	<b>FUM</b>	fumarate	<b>SUC</b>	succinate
<b>CIT</b>	Citrate	<b>OAC</b>	oxaloacétate	<b>SUCCoA</b>	succinyl-CoenzymeA

### III.A.1.c. La voie des pentoses-phosphate (ou voie PPP)

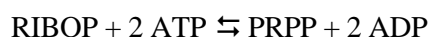
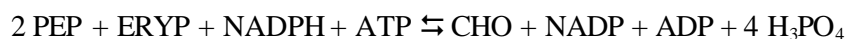


Abréviations utilisées :

<b>ERYP</b>	erythrose-4-phosphate	<b>GAP</b>	glyceraldehyde-3-phosphate	<b>XYLUP</b>	xylulose-5-phosphate
<b>F6P</b>	fructose-6-phosphate	<b>RIBUP</b>	ribulose-5-phosphate		
<b>G6P</b>	glucose-6-phosphate	<b>RIBOP</b>	ribose-5-phosphate		

### III.A.1.d. La synthèse des acides aminés

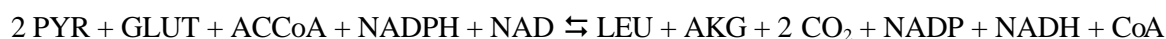
#### III.A.1.d.1. Acides aminés aromatiques



Abréviations utilisées :

<b>AKG</b>	$\alpha$ -cétooglutarate	<b>GLUT</b>	glutamate	<b>RIBOP</b>	xylulose-5-phosphate
<b>CHO</b>	Chorismate	<b>PEP</b>	phosphoénolpyruvate	<b>SER</b>	serine
<b>ERYP</b>	erythrose-4-phosphate	<b>PHE</b>	phenylalanine	<b>TRY</b>	tryptophane
<b>GAP</b>	glyceraldehyde-3-phosphate	<b>PRPP</b>	5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate	<b>TYR</b>	tyrosine
<b>GLUM</b>	Glutamine	<b>PYR</b>	pyruvate		

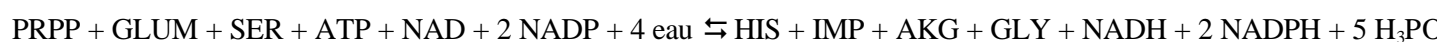
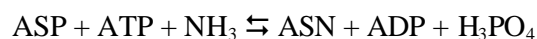
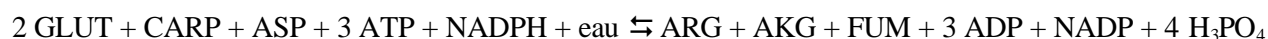
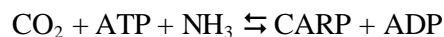
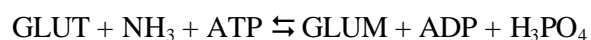
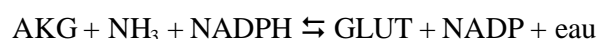
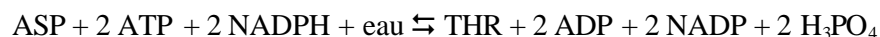
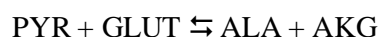
### III.A.1.d.2. Acides aminés à chaînes ramifiées



Abréviations utilisées :

<b>ACCoA</b>	acetyl-CoenzymeA	<b>GLUT</b>	glutamate	<b>PYR</b>	pyruvate
<b>AKG</b>	$\alpha$ -cétoglutarate	<b>ILEU</b>	isoleucine	<b>THR</b>	thréonine
<b>CoA</b>	CoenzymeA	<b>LEU</b>	leucine	<b>VAL</b>	valine

### III.A.1.d.3. Autres acides aminés



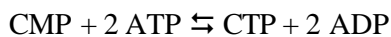
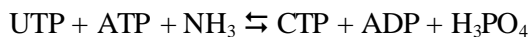
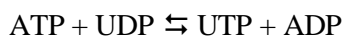
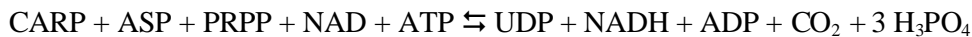
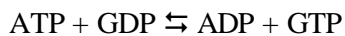
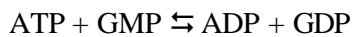
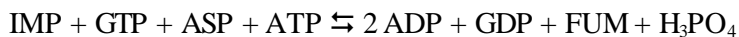
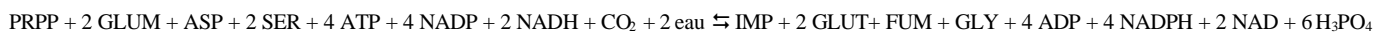
Les trois dernières réactions sont liées à la régénération des folates qui sont les facteurs de méthylation. Lorsque la demande en forme méthylée n'est pas satisfaite par la formation de glycine, la dégradation de cette dernière en  $\text{CO}_2$  et  $\text{NH}_3$  par la glycine oxydase permet d'apporter un supplément de co-facteur méthylé. Le réseau métabolique intègre également une réaction de dégradation de la sérine en pyruvate dans le cas où la synthèse de cet acide aminé est en excès par rapport à la demande pour l'anabolisme et pour la synthèse de N-méthyl-tétrahydrofolate.

Abréviations utilisées :

<b>ACCoA</b>	acetyl-CoenzymeA	<b>FUM</b>	fumarate	<b>NMH<sub>4</sub>F</b>	N-méthyltetrahydrofolate
<b>AKG</b>	α-cétoglutarate	<b>GLUM</b>	glutamine	<b>PG</b>	3-phosphoglycérate
<b>ALA</b>	Alanine	<b>GLUT</b>	glutamate	<b>PRO</b>	proline
<b>ARG</b>	Arginine	<b>GLY</b>	glycine	<b>PRPP</b>	5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate
<b>ASN</b>	Asparagine	<b>H<sub>4</sub>F</b>	tetrahydrofolate	<b>PYR</b>	pyruvate
<b>ASP</b>	Aspartate	<b>HIS</b>	histidine	<b>SER</b>	Serine
<b>CARP</b>	carbamoyl-phosphate	<b>IMP</b>	inosine-5-phosphate	<b>SUC</b>	succinate
<b>CoA</b>	CoenzymeA	<b>LYS</b>	lysine	<b>SUCCoA</b>	succinyl-CoenzymeA
<b>CYS</b>	Cystéine	<b>MET</b>	methionine	<b>THR</b>	thréonine

### III.A.1.e. La synthèse des nucléotides

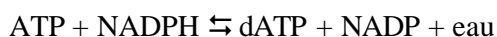
#### III.A.1.e.1. Ribonucléotides



Abréviations utilisées :

<b>ASP</b>	aspartate	<b>GLUM</b>	glutamine	<b>IMP</b>	inosine-5-phosphate
<b>CARP</b>	carbamoyl-phosphate	<b>GLUT</b>	glutamate	<b>PRPP</b>	5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate
<b>FUM</b>	fumarate	<b>GLY</b>	glycine		

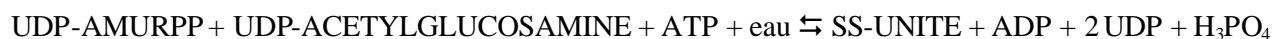
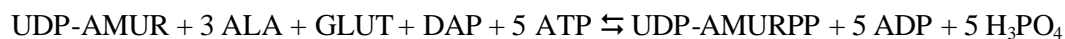
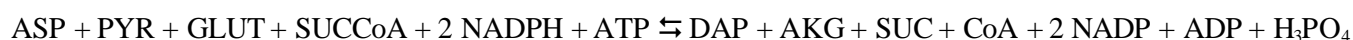
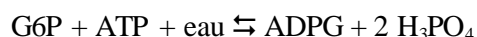
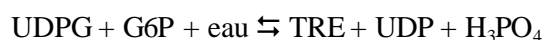
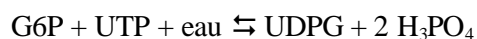
#### III.A.1.e.2. Déoxyribonucléotides



Abréviations utilisées :

<b>dATP</b>	deoxy -ATP	<b>dTTP</b>	deoxy -TTP	<b>GLY</b>	glycine
<b>dCTP</b>	deoxy -CTP	<b>dGTP</b>	deoxy -GTP	<b>SER</b>	serine

### III.A.1.f. La synthèse du tréhalose et des précurseurs des polysaccharides

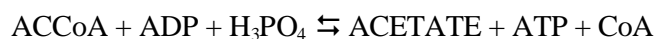
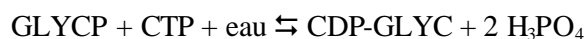
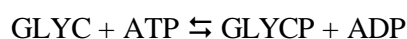
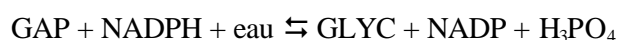


Les cinq dernières réactions représentent la synthèse du monomère du peptidoglycane, noté "SS-UNITE".

Abréviations utilisées :

<b>ADPG</b>	ADP-glucose	<b>F6P</b>	fructose-6-phosphate	<b>SUCCoA</b>	succinyl-CoenzymeA
<b>AKG</b>	$\alpha$ -cétoglutarate	<b>G6P</b>	glucose-6-phosphate	<b>SUC</b>	succinate
<b>ALA</b>	alanine	<b>GLUM</b>	glutamine	<b>TRE</b>	tréhalose
<b>ASP</b>	aspartate	<b>GLUT</b>	glutamate	<b>UDPG</b>	UDP-glucose
<b>CoA</b>	CoenzymeA	<b>PEP</b>	phosphoénolpyruvate	<b>UDP-AMUR</b>	UDP-acide muramique
<b>DAP</b>	di-amino-pimélate	<b>PYR</b>	pyruvate	<b>UDP-AMURPP</b>	UDP-acide muramique-pentapeptide

### III.A.1.g. La synthèse des acides gras et de l'acétate



Abréviations utilisées :

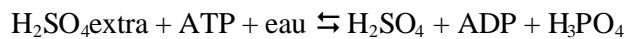
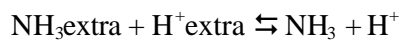
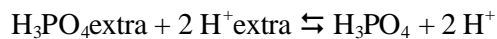
<b>ACCoA</b>	acetyl-CoenzymeA	<b>CDP-GLYC</b>	CDP-glycérol	<b>GLYC</b>	glycérol
<b>CoA</b>	CoenzymeA	<b>GAP</b>	glycéraldéhyde-3-phosphate	<b>GLYCP</b>	glycerol-phosphate

### III.A.1.h. La phosphorylation oxydative



Dans un but de simplification des calculs de flux, le rapport de phosphorylation oxydative  $\frac{P}{O}$  noté PO est supposé identique pour la régénération des co-facteurs NAD et FAD

### III.A.1.i. Les réactions de transport



Le suffixe "extra" signifie que la molécule considérée se situe dans le milieu extérieur à la cellule. En situation d'excès de carbone, des acides organiques (pyruvate,  $\alpha$ -cétoglutarate et acides gras volatils) peuvent être excrétés et le mode de transport supposé est un symport ; ces réactions de transport sont alors ajoutées au réseau métabolique présenté dans ce paragraphe.

### III.A.1.j. La synthèse des macromolécules constitutives de la biomasse

Dans ce modèle, la biomasse est considérée comme la somme pondérée des macromolécules (protéines, lipides, acides nucléiques et polysaccharides) qui la composent, ce qui est illustré par la figure n°III.A.1.j.1. Ces macromolécules sont elles-mêmes synthétisées à partir des métabolites issus des voies centrales décrites dans les paragraphes précédents. Les coefficients stoechiométriques intervenant dans ces réactions sont des paramètres symboliques dont les valeurs sont fonction des conditions expérimentales, de même que les vitesses fixées pour la résolution du système d'équations de flux (cf. paragraphe II.D.10.b. du chapitre II).

La distribution des flux est donc calculée dans un premier temps sous forme symbolique en utilisant la méthode présentée au paragraphe II.D.10.b du deuxième chapitre ; puis les paramètres symboliques (composition de la biomasse, vitesses mesurées) sont remplacés par leurs valeurs numériques expérimentales de manière à calculer la distribution des flux intracellulaires et d'échanges sous forme numérique.



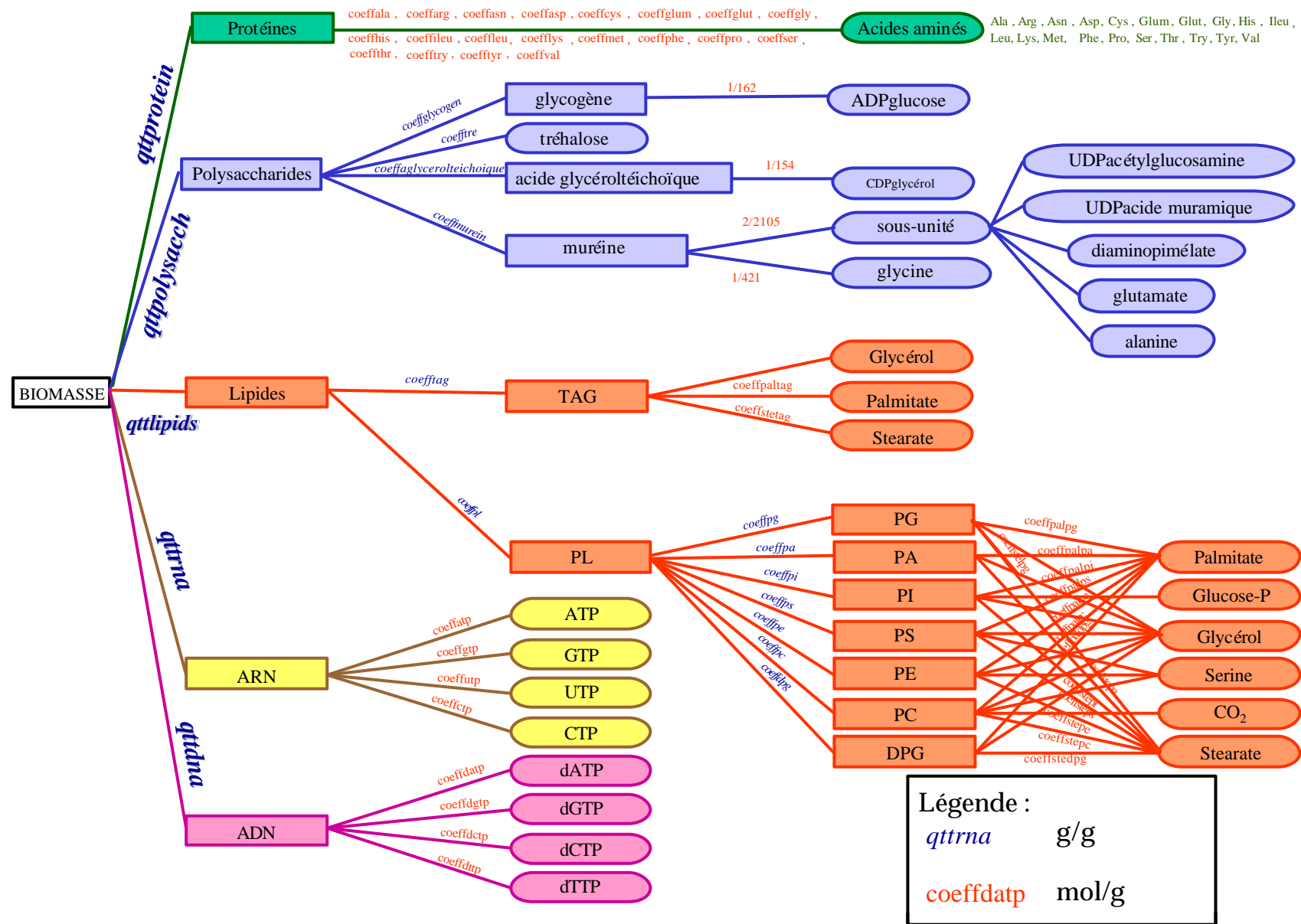


Fig. III.A.1.j.1 Structure de la biomasse

Abréviations non précédemment citées :

<b>PL</b>	phospholipides	<b>PA</b>	phosphatidate	<b>PS</b>	phosphatidylsérine	<b>PC</b>	phosphatidylcholine
<b>PG</b>	phosphatidylglycérol	<b>PI</b>	phosphatidylinositol	<b>PE</b>	phosphatidyléthanolamine	<b>DPG</b>	diphosphatidylglycérol

### III.A.1.j.1. Protéines, ADN, ARN et lipides

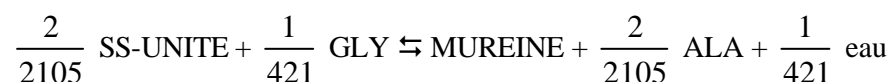
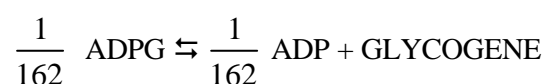
Les réactions de formation de ces macromolécules sont présentées dans l'annexe n°1. Les protéines sont synthétisées à partir des vingt acides aminés, l'ADN à partir des quatre déoxyribonucléotides, l'ARN à partir des quatre ribonucléotides, les triacylglycérols (TAG) et les différents types de phospholipides (PL) à partir de leurs précurseurs (glycérol, palmitate, stéarate, sérine, glucose-6-phosphate). Les coefficients stoechiométriques intervenant dans ces réactions s'expriment en mole de monomères par gramme de polymère formé.

### III.A.1.j.2. Polysaccharides

Les réactions de formation des différents polysaccharides (glycogène, acides glycérol-teichoïques et peptidoglycane ou muréine) ont une stoechiométrie précise. La formation d'un gramme de polymère à partir du flux molaire de monomère est déduite par proportionnalité : n moles de monomères forment  $n \times (M_m - M_e)$  grammes de polymère et x moles de monomères forment un gramme de polymère, avec  $M_m$  la masse molaire du monomère et  $M_e$  la masse molaire de la molécule éliminée pendant la réaction de polymérisation. Le coefficient stoechiométrique "x" recherché, en mole par gramme de polymère,

de cette réaction est donc égal à :  $\frac{1}{M_m - M_e}$

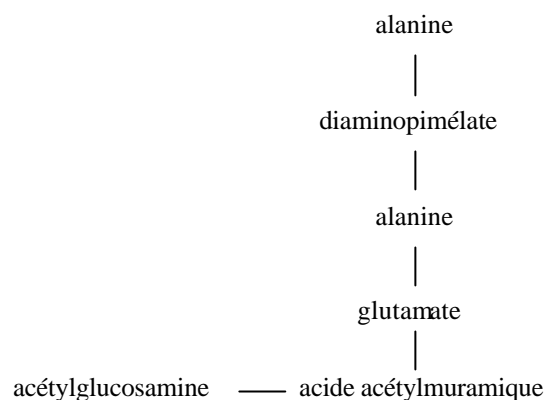
On obtient donc :



Abréviations utilisées :

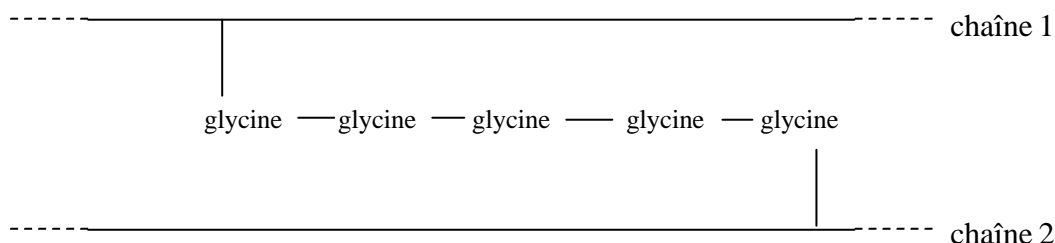
<b>ADPG</b>	ADP-glucose	<b>ALA</b>	alanine	<b>GLY</b>	glycine
<b>AGLYCEROLTEICHOIC</b>	acides glycérol-teichoïques	<b>CDP-GLYC</b>	CDP-glycérol		

La structure de la muréine est issue de la condensation du motif présenté sur la figure n°III.A.1.j.2.1



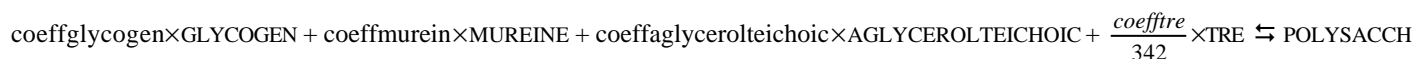
**Fig. III.A.1.j.2.1 Motif élémentaire de la muréine**

Par ailleurs, le peptidoglycane, qui est constitué de deux chaînes de ce motif, est branché (cf. figure n°III.A.1.j.2.2) via des liaisons peptidiques entre les résidus di-amino-pimélate des motifs répétés de chacune des chaînes. Le pont fait intervenir des acides aminés de nature variable suivant les espèces bactériennes ; pour les streptomyces, il s'agit principalement de glycine et d'après la base de données KEGG, cinq de ces molécules constituent le branchement chez *S.coelicolor*. La masse molaire du monomère est égale à deux fois la masse molaire de la sous-unité ; deux molécules d'alanine et cinq molécules d'eau sont globalement éliminées lors de la réaction de condensation et cinq molécules de glycine sont greffées.



**Fig. III.A.1.j.2.2 Ramification du peptidoglycane**

Ces différents types de polysaccharides sont regroupés en un pool de macromolécules dont la réaction de formation s'écrit :



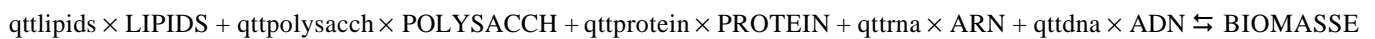
Les coefficients stoechiométriques de cette réaction s'expriment en gramme de polymère par gramme du pool de macromolécules, ce sont donc des pourcentages massiques.

De la même façon, les deux différents types de lipides (TAG et PL) sont regroupés en un pool de macromolécules dont la réaction de formation s'écrit :



### III.A.1.k. La synthèse de la biomasse

Comme indiqué précédemment, la biomasse est considérée comme la somme pondérée des cinq familles de macromolécules la constituant. La réaction de sa formation s'écrit donc :



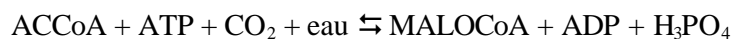
Les coefficients stoechiométriques de cette réaction s'expriment en gramme de macromolécules par gramme de biomasse. Ce sont donc des pourcentages massiques.

### III.A.2. Métabolisme secondaire

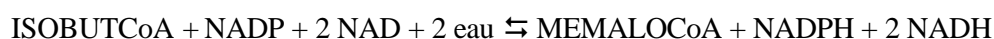
La voie de biosynthèse de la spiramycine est écrite en se basant sur les données bibliographiques présentées au paragraphe I.C.2.a. du premier chapitre.

#### III.A.2.a. Voies de synthèse des précurseurs de l'aglycone (ou platénolide)

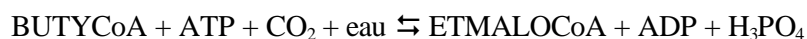
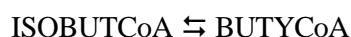
##### III.A.2.a.1. MalonylCoA



##### III.A.2.a.2. Méthyl-malonylCoA



### III.A.2.a.3. Ethyl-malonylCoA



### III.A.2.a.4. Métoxy-malonylCoA



Abréviations utilisées :

<b>ACCoA</b>	acetyl-CoenzymeA	<b>H<sub>4</sub>F</b>	tétrahydrofolate	<b>NMH<sub>4</sub>F</b>	N-méthyl-tétrahydrofolate
<b>BUTYCoA</b>	butyryl-CoenzymeA	<b>ISOBUTCoA</b>	isobutyryl-CoA	<b>OAC</b>	oxaloacétate
<b>CoA</b>	CoenzymeA	<b>MALOCOA</b>	malonyl-CoA	<b>PROPIONYLCoA</b>	propionyl-CoA
<b>ETMALOCOA</b>	ethyl-malonyl-CoA	<b>MEMALOCOA</b>	méthyl-malonyl-CoA	<b>SUCCoA</b>	succinyl-CoA
<b>GAP</b>	glycéraldéhyde-3-phosphate	<b>METOXYMALOCOA</b>	métoxy-malonyl-CoA	<b>VAL</b>	valine

### III.A.2.b. Synthèse des sucres



Abréviations utilisées :

<b>ALA</b>	alanine	<b>H<sub>4</sub>F</b>	tétrahydrofolate	<b>PMYCAMINOSE</b>	phospho-mycaminose
<b>4C6DG</b>	4-ceto-6-deoxy-glucose	<b>NMH<sub>4</sub>F</b>	N-méthyl-tétrahydrofolate	<b>PMYCAROSE</b>	phospho-mycarose
<b>G6P</b>	glucose-6-phosphate	<b>PFOROSAMINE</b>	phospho-forosamine	<b>PYR</b>	pyruvate

### III.A.2.c. Synthèse du platénolide



### III.A.2.d. Greffage des sucres, modifications terminales et transport de la spiramycine



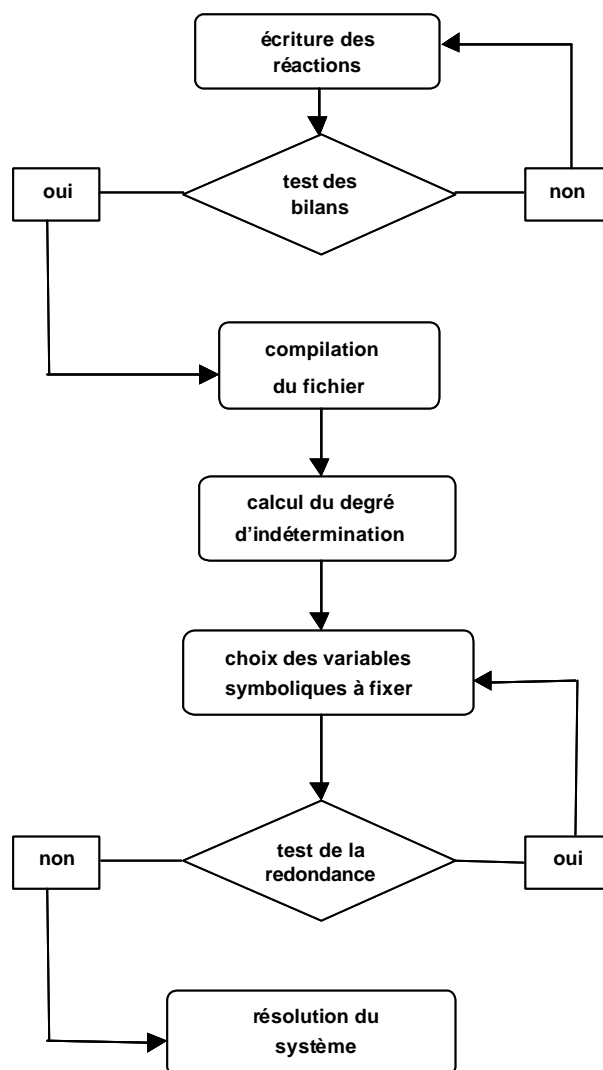
Les données stoechiométriques sur cette voie de biosynthèse sont issues de Blondelet-Rouault et *al.* (2004). En l'absence de données sur le transport de la spiramycine, l'hypothèse retenue est la diffusion simple à travers la membrane cellulaire. Par ailleurs, l'estérification de la spiramycine-I produisant les formes II et III de cet antibiotique n'est pas prise en compte dans ce modèle. Enfin, le suffixe '-I' signifie qu'il s'agit de la forme I de la molécule considérée et le suffixe "extra" signifie que la molécule se situe dans le milieu extérieur à la cellule.

### III.B. Résolution du système d'équations de flux

#### III.B.1. Logiciel de calcul symbolique des flux métaboliques

Comme indiqué au paragraphe II.D.10.d et rappelé au paragraphe III.A.1.j., la méthode utilisée pour résoudre les systèmes d'équations de flux issus des réseaux métaboliques étudiés permet d'obtenir des solutions, ou distributions de flux, sous forme symbolique. Les vitesses des réactions intracellulaires et les vitesses d'échanges de métabolites, non fixées pour la résolution du système, s'expriment comme une combinaison linéaire des vitesses fixées (cf. exemple en annexe n°2). Ce travail est réalisé par un programme de calcul symbolique des flux.

Ce programme vérifie par ailleurs que les bilans matière (C, H, O, N, P et S) et redox sont équilibrés pour chaque réaction dans laquelle tous les coefficients stoechiométriques sont sous forme numérique, avant de calculer le degré d'indétermination du système d'équations de flux ; ce paramètre correspond au nombre minimum de vitesses à fixer pour pouvoir résoudre le système d'équations issu du réseau métabolique. Il vérifie également que les vitesses fixées pour le calcul des flux ne sont pas redondantes. Ces fonctionnalités ainsi que la démarche conduisant au calcul symbolique des flux sont résumées sur la figure III.B.1.1.



**Fig. III.B.1.1 Fonctions proposées par le logiciel de construction du modèle métabolique**

### III.B.2. Résolution des systèmes d'équations de flux utilisés

La culture de *S.ambofaciens* présente des transitions métaboliques suivant les conditions environnementales : croissance non limitée, limitation carbone, carence azote... le réseau métabolique utilisé dans le modèle doit tenir compte des conditions expérimentales ; par ailleurs, le métabolisme secondaire est induit par des phénomènes de régulation qui ne sont pas pris en compte par des modèles de type MFA, il doit de ce fait être modélisé indépendamment de la phase de croissance rapide.

Ainsi quatre modèles métaboliques ont-ils été principalement étudiés dans le cas d'une croissance non limitée en culture batch, d'une croissance limitée par le carbone en culture fed-batch, d'une production de spiramycine en limitation de carbone et dans le cas où plusieurs productions d'acide ont lieu au cours de la fermentation.

### III.B.2.a. Modèle décrivant le métabolisme de *S.ambofaciens* en croissance non limitée sur milieu salin

Dans ce cadre, le métabolisme secondaire n'est pas induit et le modèle métabolique se limite à décrire le métabolisme central de la bactérie en incluant les réactions décrites au paragraphe III.A.1.

Il intègre également l'excrétion d'acétate qui est le seul coproduit présent en quantité significative. Le modèle inclut 96 réactions impliquant 108 métabolites dont 10 extracellulaires (glucose, eau, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sup>+</sup>, acétate, biomasse) ; cependant, du fait des redondances, le système d'équations correspondant est sousdéterminé.

L'analyse de ce système montre qu'il faut alors fixer trois vitesses non redondantes pour calculer la distribution des flux stationnaires dans les voies métaboliques. Les vitesses choisies sont la vitesse spécifique de consommation de glucose ( $q_s$ ), la vitesse spécifique de production d'acétate ( $v_{\text{acétate}}$ ) et le taux de croissance ( $\mu$ ).

### III.B.2.b. Modèle décrivant le métabolisme de *S.ambofaciens* en croissance limitée par le carbone sur milieu salin

La croissance est limitée par le glucose à  $\mu$  suffisamment élevé pour que le métabolisme secondaire ne soit pas induit tout en minimisant la quantité d'acétate produite ( $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$ ). L'excrétion d'acétate n'est pas intégrée dans le modèle qui comprend donc 95 réactions impliquant 107 métabolites dont 9 extracellulaires.

Il faut alors fixer deux vitesses non redondantes pour calculer la distribution des flux. Les vitesses choisies sont la vitesse spécifique de consommation de glucose ( $q_s$ ) et la vitesse spécifique de consommation d'oxygène ( $q_{O_2}$ ). Ce choix de calcul permettra de pouvoir calculer les flux métaboliques en ligne lors d'une culture discontinue alimentée en bioréacteur instrumenté.



### III.B.2.c. Modèle décrivant le métabolisme secondaire de *S.ambofaciens* en culture limitée par le carbone sur milieu salin

Le réseau métabolique intègre dans ce cas les réactions des voies centrales ainsi que les réactions des voies du métabolisme secondaire décrites au paragraphe III.A.2. Le modèle inclut alors 115 réactions impliquant 124 métabolites dont 10 extracellulaires (glucose, eau, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sup>+</sup>, spiramycine, biomasse), le système correspondant est donc sous-déterminé.

Du fait des redondances, l'analyse de ce système montre qu'il faut fixer six vitesses non redondantes pour calculer la distribution des flux. Seules trois vitesses macroscopiques sont linéairement indépendantes dans ce cas, il est par conséquent nécessaire de fixer trois vitesses de réactions intracellulaires, non redondantes, pour déterminer les flux métaboliques de façon unique. Par exemple, il est possible de fixer la vitesse de la réaction d'embranchement vers la voie des pentoses-phosphate (glucose-6-phosphate  $\rightleftharpoons$  ribulose-5-phosphate), la vitesse de réaction de la voie anaplérotique (PEP  $\rightleftharpoons$  oxaloacétate) et la vitesse de dégradation de la valine (valine  $\rightleftharpoons$  isobutyrylCoA) qui sont les vitesses de réactions situées à des points clés du métabolisme primaire ou secondaire.

La mesure des vitesses intracellulaires nécessite des techniques de marquage, coûteuses et limitées aux faibles volumes réactionnels. Il est exclu de pouvoir construire un modèle destiné à la supervision d'un procédé industriel à partir de la mesure, entre autre, de ce type de vitesses. Une stratégie de simplification du réseau métabolique ou de la technique de modélisation est donc nécessaire pour pouvoir modéliser la production de spiramycine à partir de mesures accessibles en ligne sur un bioréacteur instrumenté.

### III.B.2.d. Modélisation des cultures pendant lesquelles plusieurs productions d'acides organiques ont lieu

Comme indiqué dans le premier chapitre aux paragraphes I.B.3 et I.C.2.b.3, plusieurs acides organiques (pyruvate,  $\alpha$ -cétoglutarate, acides gras volatils) peuvent être excrétés au cours des cultures de *S.ambofaciens*. Chaque voie de production d'un acide intégrée au modèle considéré augmente le degré d'indétermination du système d'équation d'une unité. Ainsi le modèle cité au point précédent,

s'il intègre les productions d'acides pyruvique,  $\alpha$ -cétoglutarique, acétique et isobutyrique, doit-il être résolu en fixant au minimum non plus six mais dix vitesses dont trois intracellulaires.

### III.C. Valeurs nominales des paramètres symboliques du modèle

Pour obtenir une expression numérique de la distribution des flux dans les voies métaboliques, il est nécessaire d'utiliser des valeurs numériques pour les vitesses fixées pour le calcul ainsi que pour les coefficients stoechiométriques symboliques utilisés dans les voies de synthèse de la biomasse. Dans un premier temps, des valeurs moyennes (ou nominales) sont déterminées pour ces paramètres à partir de données bibliographiques.

#### III.C.1. Paramètres de composition de la biomasse

Les valeurs nominales des paramètres de composition de la biomasse en macromolécules ainsi que celles des paramètres de composition de ces dernières en monomères sont issues des données bibliographiques sur les *Streptomyces*. Ces paramètres sont les coefficients stoechiométriques des réactions biochimiques de formation et d'assemblage des macromolécules pour former la biomasse. Ils apparaissent dans les réactions présentées dans l'annexe n°1.

##### III.C.1.a. Composition macromoléculaire

Les pourcentages massiques de certaines macromolécules dans les cellules de souches de *Streptomyces*, issus de la bibliographie, sont résumés sur le tableau III.C.1.a.1

**Tab. III.C.1.a.1 Paramètres de composition macromoléculaire de *Streptomyces***

composé \ auteur	<b>Shahab et al.</b> (1996)	<b>Schauner et al.</b> (1999)	<b>McBride et Ensign</b> (1987) <b>Rueda et al.</b> (2001)	<b>Streshinskaïa et al.</b> (1979)
protéines	40,07%	-	-	-
ADN	3,7%	-	-	-
ARN	12%	-	-	-
lipides	-	10,6%	-	-
polysaccharides	-	-	22,4% (réserves)	12% (paroi)

La somme des pourcentages étant supérieure à cent, il a été décidé de ramener la somme des polysaccharides à 30% (12% pour la paroi et 18% pour les réserves, ces dernières présentant la plus grande variabilité suivant les conditions de culture) et le pourcentage d'ARN à 12, valeur proche de la moyenne pour les taux de croissance envisagés dans cette étude (0 à 0,15 h<sup>-1</sup>). Le choix de ces valeurs est une hypothèse de modélisation dont il faudra vérifier par la suite la cohérence avec les données devant être modélisées. Un total de 96,37% est ainsi obtenu et la composition macromoléculaire nominale retenue pour le modèle est déduite en ramenant le total à 100% par proportionnalité sur les différents paramètres (cf. tableau III.C.1.a.2)

**Tab. III.C.1.a.2 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques de la réaction de formation de la biomasse**

	valeur g.g <sup>-1</sup>
qttprotein	0,4158
qttlipids	0,11
qtt dna	0,0384
qtrna	0,1245
qttpolysacch	0,3113

### III.C.1.b. Composition des macromolécules

#### III.C.1.b.1. Acides nucléiques

D'après les données de Laskin et Lechevalier (1977), la moyenne du G+C de 98 souches de *Streptomyces* recensées est de 72,23% avec un écart-type de 1,95. Il est donc supposé que *S.ambofaciens* se situe dans la moyenne et contient 36,1% de G (ce sont des pourcentages massiques donc il y a 36,1 g de G pour 100 g d'acide nucléique), 36,1% de C, 13,9% de A et 13,9% de T ou U. Par ailleurs, chaque accrochage de nucléotide entraîne la libération d'une molécule de pyrophosphate. Le coefficient stoechiométrique attribué au nucléotide XTP (X = A, T, U, G ou C) dans la réaction de polycondensation de l'acide nucléique AYN (Y = D ou R) en mole par gramme d'acide nucléique est

donc égal à :

$$\frac{mole_{XTP}}{g_{AYN}} = \frac{g_{XTP}}{g_{AYN}} \times \frac{1}{M_{XTP} - M_{PP}}$$

avec  $M_{XTP}$  et  $M_{PP}$  les masses molaires respectives du nucléotide XTP et du pyrophosphate (175 g.mole<sup>-1</sup>). Les différents coefficients stoechiométriques sont calculés en utilisant cette formule ainsi que les données de composition de l'ADN et leurs valeurs sont listées dans le tableau III.C.1.b.1.1

**Tab. III.C.1.b.1.1 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques des réactions de formation des acides nucléiques**

	valeur g.g <sup>-1</sup>	M g.mole <sup>-1</sup>	valeur mole.g <sup>-1</sup>
coeffatp	0,139	503	0,00042
coeffgtp	0,361	519	0,00105
coeffuto	0,139	480	0,00046
coeffctp	0,361	478	0,00119
coeffdatp	0,139	487	0,00045
coeffdgtg	0,361	503	0,00110
coeffdctp	0,361	462	0,00126
coeffdttp	0,139	476	0,00046

#### III.C.1.b.2. Protéines

Les valeurs nominales des coefficients stoechiométriques attribués aux différents acides aminés dans la réaction biochimique de formation des protéines sont basées sur l'aminogramme de *Streptomyces argenteolus* ATCC11009, actinomycète mésophile [Craveri et al. (1973)]. Les pourcentages massiques de chaque acide aminé ont été corrigés pour avoir un total de 100%. Les pourcentages obtenus sont ramenés en mole.g<sup>-1</sup> en divisant par la masse molaire de l'acide aminé considéré. Les valeurs obtenues pour les coefficients stoechiométriques en mole d'acide aminé par gramme de protéine sont rassemblées dans le tableau III.C.1.b.2.1

### III.C.1.b.3. Polysaccharides

Les polysaccharides sont regroupés en un pool formé par l'ensemble des polysaccharides synthétisés dans les voies centrales (glycogène, tréhalose et paroi). Les coefficients stoechiométriques intervenant dans la réaction de formation de ce pool sont égaux aux proportions des différents types de polysaccharides dans ce dernier.

D'après Rueda et *al.*(2001), le glycogène représente 3 à 22% de la matière sèche et le tréhalose 1,5 à 18%, selon les conditions. D'après McBride et Ensign (1987), le tréhalose représente 1 à 25% de la matière sèche. On se place au milieu de l'intervalle :  $\%_{\text{glycogène}} = 11,8 \text{ g.g}_{\text{biomasse}}^{-1}$  ;

**Tab. III.C.1.b2.1 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques de la réaction de formation des protéines**

paramètre	valeur mole.g <sup>-1</sup>	paramètre	valeur mole.g <sup>-1</sup>
coeffala	0,00146	coeffleu	0,00068
coeffarg	0,00035	coefflys	0,00028
coeffasn	0,00037	coeffmet	0,00010
coeffasp	0,00037	coeffphe	0,00017
coeffcys	0,00005	coeffpro	0,00049
coeffglum	0,00036	coeffser	0,00046
coeffglut	0,00036	coeffthr	0,00052
coeffgly	0,00135	coefftry	0,00006
coeffhis	0,00011	coefftyr	0,00012
coeffleu	0,00026	coeffval	0,00061

$\%_{\text{tréhalose}} = 10,6 \text{ g.g}_{\text{biomasse}}^{-1}$  soit un total de 22,4%, qui est proportionnellement corrigé à 18% puisque cette valeur nominale a été choisie pour les réserves. Comme le pourcentage nominal de polysaccharides choisi est égal à  $31,13 \text{ g.g}_{\text{biomasse}}^{-1}$ , on a finalement  $\%_{\text{glycogène}} = 31,6 \text{ g.g}_{\text{polysaccharides}}^{-1}$  et  $\%_{\text{tréhalose}} = 28,4 \text{ g.g}_{\text{polysaccharides}}^{-1}$ . Le total représentant 60% des polysaccharides, les 40% restant sont constitués de muréine (ou peptidoglycane) et d'acides glycérolteichoïques.

D'après Skobilova et *al.*(1983), la muréine représente 50% de la matière sèche de la paroi de *S.roseoflavus* var. *roseofungi*. Des données plus précises sont disponibles pour *Bacillus subtilis* [Kruissen et *al.*(1980)], en moyenne la muréine représente 43,45% de la paroi (pourcentage corrigé pour obtenir un total de 100%), le reste étant supposé être constitué d'acides glycérolteichoïques ; il en est déduit que  $\%_{\text{muréine}} = 17,4 \text{ g.g}_{\text{polysaccharides}}^{-1}$  et  $\%_{\text{acides téichoïques}} = 22,6 \text{ g.g}_{\text{polysaccharides}}^{-1}$ .

Les valeurs obtenues pour les coefficients stoechiométriques en gramme de chaque polysaccharide par gramme de polysaccharides totaux sont rassemblées dans le tableau III.C.1.b.3.1.

**Tab. III.C.1.b.3.1 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques de la réaction de formation du pool de polysaccharides**

	valeur g.g <sup>-1</sup>
coeffglycogen	0.316
coefftre	0.284
coeffmurein	0.174
coeffaglycerolteichoic	0.226

#### III.C.1.b.4. Lipides

De la même façon que les polysaccharides, les lipides sont regroupés en un pool rassemblant les phospholipides et les triacylglycérols. D'après Schauner et *al.*(1999), les lipides de *S.ambofaciens* sont constitués de phospholipides (PL), de fractions neutres et de glycolipides (ces derniers sont présents en quantité négligeable). Les fractions neutres contiennent les triacylglycérols (TAG) et les pigments. Ces derniers sont regroupés avec les TAG car ils ne sont pas identifiés. D'après ces données, il est supposé que :  $\%_{\text{TAG}} = 62,5 \text{ g.g}_{\text{lipides}}^{-1}$  et  $\%_{\text{PL}} = 37,5 \text{ g.g}_{\text{lipides}}^{-1}$

Les coefficients stoechiométriques de la réaction de formation du pool de lipides sont présentés dans le tableau III.C.1.b.4.1

**Tab. III.C.1.b.4.1 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques de la réaction de formation du pool de lipides**

	valeur g.g <sup>-1</sup>
coefftag	0.625
coeffpl	0.375

D'après Schauner et *al.*(1999), les phospholipides sont constitués de diphosphoglycérol (DPG), de phosphatidyléthanolamine (PE), de phosphatidylinositol (PI) et de lysophosphatidyléthanolamine (dosée avec le PI). En revanche, il n'y a ni phosphatidate (PA), ni phosphatidylsérine (PS), ni phosphatidylcholine (PC), ni phosphoglycérol (PG) qui peuvent être présents chez d'autres microorganismes. En pourcentage corrigé pour obtenir un total de 100%, le DPG représente en moyenne 45,38% de la masse des PL (écart-type 2,44), la PE, 41,53% (écart-type 2,77), le PI, 13,09% (écart-type 3,46). Les coefficients stoechiométriques de la réaction de formation du pool de phospholipides sont regroupés dans le tableau III.C.1.b.4.2

**Tab. III.C.1.b.4.2 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques de la réaction de formation du pool de phospholipides**

	valeur g.g <sup>-1</sup>
coeffpa	0
coeffpi	0.1309
coeffps	0
coeffpe	0.4153
coeffpc	0
coeffdpg	0.4538

Schauner et *al.*(1999) ont également déterminé la composition des phospholipides en acides gras. Les molécules en C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>18</sub> et C<sub>20</sub> ont été dosées. Dans le modèle construit dans cette thèse, les C<sub>15</sub> / C<sub>16</sub> sont regroupés ainsi que les C<sub>17</sub> / C<sub>18</sub> / C<sub>20</sub>. Les pourcentages sont corrigés de manière à obtenir un total de 100% et il résulte en moyenne 61,14% en g.g<sub>phospholipides</sub><sup>-1</sup> pour les C<sub>16</sub> (palmitate), 38,86% pour les C<sub>18</sub> (stéarate). En l'absence de données chiffrées pour la composition des TAG en acides gras, il a été supposé qu'elle était identique à celle des phospholipides. En utilisant ces données et en se basant sur les réactions de formation des PL et des TAG à partir du palmitate et du stéarate, il est possible de calculer les coefficients stoechiométriques attribués à ces derniers dans ces réactions. Ils sont listés dans le tableau III.C.1.b.4.3.

**Tab. III.C.1.b4.3 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques des réactions de formation des PL et des TAG**

paramètre	valeur mole.g <sup>-1</sup>	paramètre	valeur mole.g <sup>-1</sup>
coeffpaltag	0,00228	coeffpalpe	0,00179
coeffstetag	0,00131	coeffstepe	0,00103
coeffpalpi	0,00153	coeffpaldpg	0,00182
coeffstepi	0,00088	coeffstedpg	0,00105

### III.C.2. Paramètres énergétiques

Dans le modèle, deux paramètres sont liés à l'énergie requise pour l'anabolisme : n et nb qui sont respectivement les coefficients stoechiométriques attribués à l'ATP et au GTP dans la réaction de formation des protéines.

Ils s'expriment en mole par gramme de protéine et les valeurs retenues sont issues de celles utilisées dans le modèle stoechiométrique de *Kluyveromyces marxianus* [Bideaux (2000)] : n = 0.0002 et nb = 0.000001

Le dernier paramètre restant à fixer est le rapport de phosphorylation oxydative  $\frac{P}{O}$  ; les données bibliographiques présentées dans le chapitre I montrent que les valeurs utilisées pour les modèles de *Streptomyces* sont proches de 2 pour la régénération des NAD et de deux tiers de cette valeur pour celle des FAD. Dans le paragraphe III.A.1.h, il a été signalé qu'un seul paramètre lié à la phosphorylation oxydative est utilisé dans ce modèle. Cette simplification a également été utilisée dans le modèle de *Kluyveromyces marxianus* [Bideaux (2000)] et il apparaît dans cette étude qu'une valeur consensus de 0,6 permet de modéliser avec précision différents types de métabolisme de cette levure.

Des valeurs égales à 2 et 0,5 pour le rapport  $\frac{P}{O}$ , qui bornent les deux valeurs précitées, ont été testées dans le modèle développé lors de cette thèse en calculant des distributions des flux nominales. Pour cela, les valeurs nominales déterminées dans ce paragraphe sont utilisées pour remplacer les



paramètres symboliques du modèle et les flux métaboliques sont calculés dans le cadre des conditions de croissance non limitée déterminées en culture batch sur milieu synthétique de *S.ambofaciens* :

- Vitesse spécifique de consommation de glucose ( $q_s$ ) = 0,00194 mole.g<sub>x</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>
- Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,15 h<sup>-1</sup>
- Vitesse spécifique de production d'acétate ( $v_{\text{acétate}}$ ) = 0,00017 mole.g<sub>x</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>

La figure III.C.2.1 présente une synthèse du résultat du calcul des flux centraux pour une valeur du

paramètre  $\frac{P}{O}$  égale à 2. Le symbole transaminations regroupe les flux dans les voies où le glutamate

est transformé en  $\alpha$ -cétoglutarate lors de l'amination d'un métabolite. Le symbole x signifie que le flux est dirigé vers la synthèse d'un ou plusieurs précurseurs de la biomasse. Lorsque la valeur du flux est positive, la réaction a lieu dans le sens indiqué par la flèche ; dans le cas contraire, une valeur négative pour le flux indique que la réaction se déroule en sens inverse de celui indiqué par la flèche.

Des anomalies apparaissent alors de manière évidente dans la distribution des flux calculés avec cette

valeur de rapport  $\frac{P}{O}$  : le cycle TCA fonctionne à l'envers (oxaloacétate → fumarate → succinate → succinyl-CoA →  $\alpha$ -cétoglutarate → citrate) et la réaction de formation d'acétyl-CoA à partir de pyruvate, qui est irréversible, a lieu dans le sens incorrect. De même, la réaction PEP → pyruvate, telle qu'elle est écrite dans le réseau métabolique, est catalysée par la pyruvate kinase qui n'est pas réversible or le flux calculé pour cette réaction est négatif.

Le même calcul a été réalisé en modifiant uniquement la valeur du rapport de phosphorylation oxydative et en la prenant égale à 0,5. Le résultat est présenté sur la figure III.C.2.2. Elle met en évidence que les anomalies au niveau du cycle TCA, de la formation du pyruvate et de la transformation de ce dernier en acétyl-CoA sont corrigées ; de ce fait, la sensibilité des flux à la valeur

du rapport  $\frac{P}{O}$  apparaît d'ors et déjà importante. Par ailleurs, la figure III.C.2.2 met en évidence que la

répartition des flux dans les voies glycolytiques est équilibrée : 54% du carbone entrant pour la voie

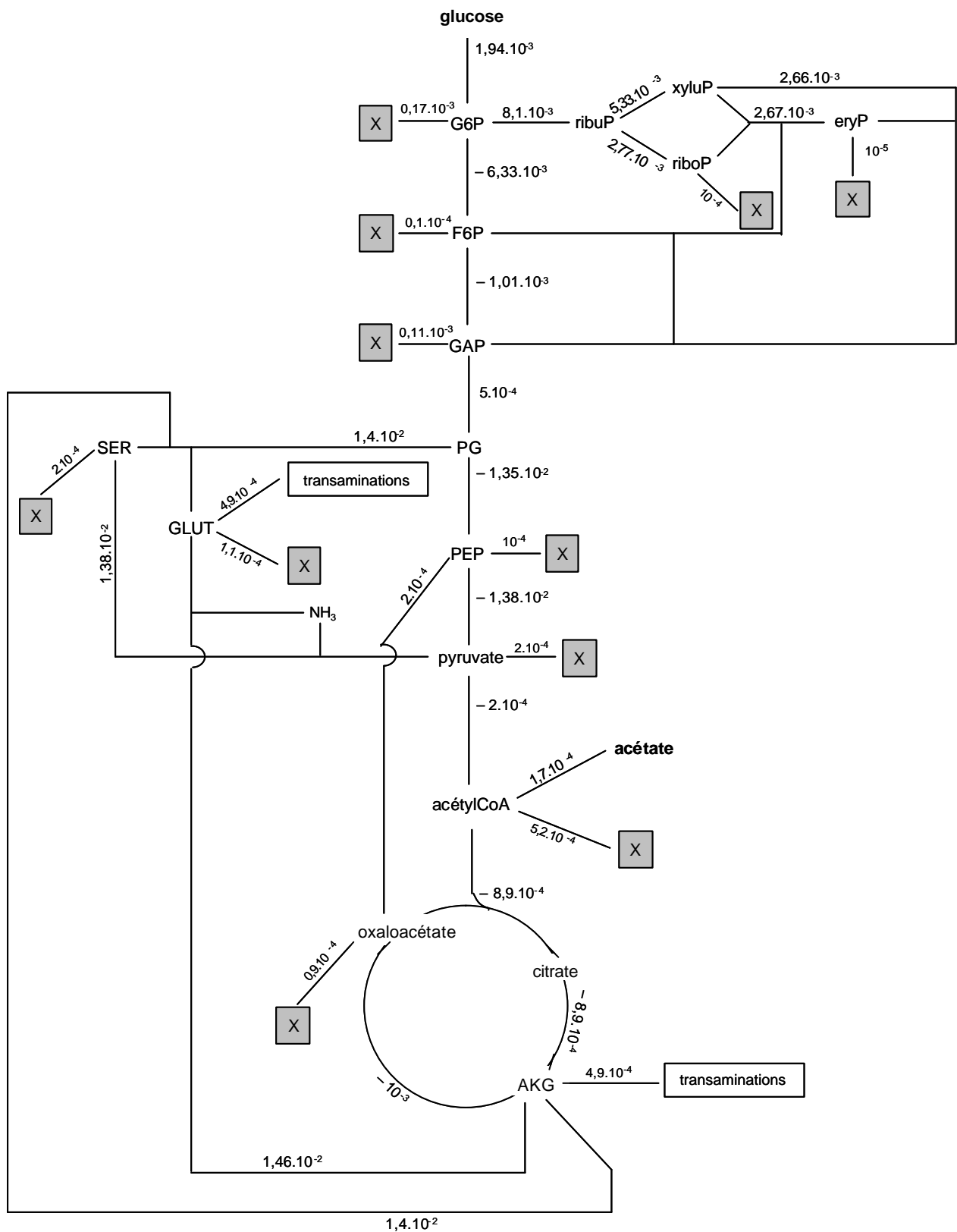


Fig. III.C.2.1 Distribution des flux nominaux pour un rapport  $\frac{P}{O}$  égal à 2



PPP et 46% pour la glycolyse, ce qui est conforme aux résultats de Jonsbu et *al.* (2001) issus du calcul des flux par marquage isotopique.

### III.D. Analyse de la sensibilité des flux à la variation des paramètres du modèle

Une fois que des valeurs nominales sont déterminées pour les paramètres symboliques du modèle, il peut être intéressant de calculer la sensibilité des vitesses de réaction calculées à la variation de la valeur des paramètres symboliques et des vitesses fixées pour le calcul.

#### III.D.1. Principe

L'analyse de sensibilité a pour but de vérifier si les fonctions étudiées (ici les flux métaboliques) sont stables ou non par rapport à la variation des paramètres du modèle i.e. vérifier *a priori* la robustesse de ce dernier. Elle permet de déterminer quels sont les paramètres dont les variations ont un effet significatif sur la valeur des fonctions et quelles sont les variables dont l'effet est négligeable. Ces dernières pourront être éliminées du modèle en les remplaçant par leurs valeurs nominales. Ceci permet de diminuer le temps de calcul pour les simulations dynamiques des cultures.

La fonction de sensibilité  $S$  d'une fonction  $f(x)$  du modèle est définie par  $S = \frac{\partial \ln f(x)}{\partial \ln(x)}$  ; si  $f$  est

fonction de  $n$  paramètres  $(x_1, \dots, x_n)$ , la sensibilité de  $f$  à la variation du paramètre  $x_i$ , les autres paramètres étant fixés à leurs valeurs nominales, est donné par :  $\frac{\partial \ln f(x_1, \dots, x_n)}{\partial \ln(x_i)}$ . La sensibilité de

chaque vitesse a donc été calculée pour une valeur nominale des paramètres déterminés au paragraphe III.C. pour le modèle décrivant le métabolisme de *S.ambofaciens* en croissance limitée par le carbone sur milieu salin.

#### III.D.2. Résultats

L'influence de chaque paramètre sur les flux a été analysée en relevant en premier lieu le nombre de flux dans lesquels le paramètre considéré apparaît puis en relevant le nombre de flux pour lesquels les sensibilités sont inférieures à 5%, comprises entre 5 et 10% et strictement supérieures à 10%.

variable	nbre de réactions	1%<=s<=5%	5%<=s<=10%	s>10%	commentaire (réactions pour lesquelles le paramètre a une influence non négligeable)
PO	22	0	0	22	glycolyse, PP, cycle TCA, synthèse et dégradation de la serine, synthèse du glutamate, chaîne respiratoire
coeffaglycerolteichoic	101	90	4	7	synthèse du CTP, du CDPglycérol, des aglycerolteichoic, transport de p, Rp
coeffala	101	78	11	12	PP, synthèse du pyruvate, PRPP, serine, alanine, glutamate, GTP, dégradation de la serine, transport de h
coeffarg	101	88	10	3	PP, synthèse du carbP, de l'arginine
coeffasn	101	91	8	2	PP, synthèse de l'asparagine
coeffasp	101	97	4	0	
coeffatp	101	90	8	3	dégradation de la glycine, synthèse de l'ATP
coeffctp	101	88	6	7	synthèse du PRPP, carbP, UTP, CTP, transport de p, Rp
coeffcys	101	97	0	4	synthèse de la cysteine, acetate, transport de so, Rso
coeffdatp	101	97	2	2	synthèse de l'ATP, du dATP
coeffdctp	101	95	2	4	synthèse du carbP, UDP, CTP, dCTP
coeffdgtg	101	89	6	6	dégradation de la glycine, synthèse de la glutamine, IMP, GMP, GDP, dGTP
coeffdgq	101	90	3	8	PP, synthèse du palmitate, stéarate, DPG,
coeffdtg	101	96	3	2	synthèse du dCTP, dTTP
coeffglum	101	94	6	1	synthèse de la glutamine
coeffglut	101	99	2	0	
coeffgly	101	78	15	8	PP, dégradation de la glycine, synthèse du glutamate, GTP,
coeffglycogen	101	7	81	13	glycolyse, PP, cycle TCA, synthèse et dégradation de la serine, synthèse du glutamate, ADPglucose, glycogène
coeffgtg	101	77	8	16	PP, synthèse de la serine, PRPP, glutamate, glutamine, IMP, GMP, GDP, dégradation de la serine et glycine, transport de p, Rp
coeffhis	101	92	6	3	dégradation de la glycine, synthèse de l'histidine, ATP
coeffileu	101	99	0	2	synthèse de la threonine, isoleucine
coeffleu	101	24	76	1	synthèse de la leucine
coefflys	101	19	1	1	synthèse de la lysine
coeffmet	101	94	0	7	synthèse et dégradation de la glycine, synthèse de la cysteine, methionine, acetate, transport de so, Rso
coeffmurein	101	72	12	17	PP, synthèse de la serine, glutamate, UTP, peptidoglycane, acetate, mureine, dégradation de la serine et glycine
coeffpaldg	101	95	5	1	synthèse du palmitate
coeffpalpe	101	95	5	1	synthèse du palmitate
coeffpalpi	101	101	0	0	
coeffpaltag	101	4	78	19	glycolyse, PP, cycle TCA, synthèse et dégradation de la serine, synthèse du glutamate, palmitate,
coeffpe	101	90	7	4	PP, synthèse de PE
coeffphe	101	99	0	2	synthèse du cho, phe
coeffpi	101	100	0	1	synthèse de PI
coeffpl	101	8	74	19	glycolyse, PP, synthèse et dégradation de la serine, synthèse du glutamate, palmitate, stearate, PE, PI, DPG, PL
coeffpro	101	98	2	1	synthèse de la proline
coeffser	101	92	8	1	PP
coeffstedg	101	99	1	1	synthèse du stearate
coeffstepe	101	99	1	1	synthèse du stearate
coeffstepi	101	101	0	0	
coeffstetg	101	7	85	9	PP, synthèse et dégradation de la serine, synthèse du glutamate, stearate
coefftag	101	4	2	95	influence négligeable sur : synthèse du G3P, 3PG, acetylCoA, glycerol, régénération NAD, Reau
coeffthr	101	93	6	2	synthèse de l'aspartate, threonine
coefftre	101	7	80	14	glycolyse, PP, synthèse et dégradation de la serine, synthèse du glutamate, UTP, UDPglucose, trehalose
coefftry	101	99	0	2	synthèse du chorismate, tryptophane
coefftyr	101	99	0	2	synthèse du chorismate, tyrosine
coeffutp	101	97	2	2	synthèse du carbP, UDP
coeffval	101	99	1	1	synthèse de la valine
n	24	24	0	0	
nb	25	25	0	0	
gttdna	101	75	9	17	PP, synthèse du PRPP, carbP, glutamine, IMP, nucléotides, deoxynucléotides, DNA, dégradation de la glycine
attlipids	101	3	2	96	influence négligeable sur : synthèse du 3PG, acetylCoA, glycerol, régénération NAD, Reau
attpolysacch	101	2	1	98	influence négligeable sur : régénération NAD, Reau, Rco
attprotein	101	3	2	96	influence négligeable sur : synthèse de l'acetylCoA, carbP, régénération NAD, Reau, Rco
gttrna	101	5	69	27	PP, synthèse du F6P, OAC, PRPP, serine, aspartate, glut, glum, carb P, IMP, nucleotide, RNA, dégradation de la serine et glycine, transport de p et nh, Rp, Rn

Tab. III.D.2.1 Analyse de la sensibilité du modèle décrivant le métabolisme de *S.ambofaciens* en croissance limitée par le carbone sur milieu salin

L'influence de la variation d'un paramètre sur un flux est jugée significative si la sensibilité de ce dernier est strictement supérieure à 10% ; le résultat de cette analyse de sensibilité est résumé dans le tableau III.D.2.1. dans lequel les cinq paramètres les plus critiques apparaissent en gras. L'influence de la valeur du rapport de phosphorylation oxydative, mise en évidence au paragraphe III.C.2., se retrouve dans cette analyse car les valeurs de plus d'une vingtaine de flux des voies majeures sont affectés de plus de 10% lorsque la valeur de  $\frac{P}{O}$  varie de cet ordre. Par ailleurs les coefficients stoechiométriques attribués aux polysaccharides, lipides et protéines dans la réaction de formation de la biomasse, de même que celui attribué aux TAG dans la formation des lipides, sont des paramètres fondamentaux du modèle du métabolisme central. Une variation significative de ces paramètres bouleverse la distribution des flux calculés. Il est donc nécessaire de se placer dans des conditions expérimentales telles que les valeurs de ces paramètres ne varient pas significativement, ou de déterminer l'évolution de ces dernières au cours de la culture.

Les autres paramètres dont la variation a une influence significative sur les flux (i.e. leurs sensibilités sont supérieures à 10%) concernent des voies bien précises. Par exemple, le paramètre "coeffglum" a une influence non négligeable sur le flux dans la voie de synthèse de la glutamine ce qui paraît logique. Etant donné que les flux dans ces voies sont beaucoup plus faibles que dans les voies glycolytiques, l'erreur de calcul due à la variation de la valeur d'un paramètre symbolique est négligée.

Dans un premier temps, il est décidé de remplacer les paramètres symboliques de composition de la biomasse par leurs valeurs nominales présentées dans le paragraphe III.C. et de limiter l'étude du paramétrage à la détermination de valeurs adéquates pour le rapport de phosphorylation oxydative  $\frac{P}{O}$ .

Suivant les résultats de modélisation obtenus avec ce type de paramétrage, une conclusion pourra être avancée quant à sa validité.

### III.E. Stratégies de modélisation

#### III.E.1. Problématique

La résolution des systèmes d'équation de flux issus des modèles métaboliques présentée au paragraphe III.B.2. montre que le calcul des flux dans les voies centrales et secondaires nécessite entre autre la mesure de trois vitesses intracellulaires non redondantes. Or le but de ce modèle MFA est de servir au développement d'un capteur logiciel qui pourrait être utilisé pour la supervision du procédé de production de la spiramycine. Etant donné qu'il est à l'heure actuelle exclu de pouvoir mesurer de telles vitesses à l'échelle industrielle voire même pilote, il est nécessaire de simplifier le modèle afin que les valeurs d'entrée de ce dernier soient des mesures accessibles en ligne dans les procédés industriels.

#### III.E.2. Simplification du modèle métabolique

Le modèle métabolique peut être simplifié d'une part en réduisant le degré d'indétermination du système d'équations de flux de manière à devoir mesurer un nombre moins important de vitesses de réactions ou d'autre part en émettant des hypothèses sur la biosynthèse de la spiramycine à partir des données bibliographiques disponibles et mettre en œuvre une structure hybride stoechiométrique/phénoménologique.

- Le degré d'indétermination du modèle métabolique présenté au paragraphe III.B.2.c, incluant les voies centrales et secondaires, est notablement élevé en partie du fait des multiples voies de synthèse existant pour une partie des précurseurs de la spiramycine. Par exemple, le malonylCoA peut être produit par trois voies différentes dont ce précurseur est le produit final. Une simplification possible est de ne considérer qu'une seule voie de biosynthèse pour chaque précurseur ; le degré d'indétermination du système d'équations de flux correspondant est alors égal à quatre au lieu de six (cf. paragraphe III.B.2.c) et le système peut être résolu en fixant les vitesses de consommation de glucose, d'ammonium, d'oxygène et de production de CO<sub>2</sub>. Une telle simplification présente l'inconvénient de perdre de l'information et peut par ailleurs se

révéler hasardeuse en l'absence de données claires sur les voies qui peuvent être actives ou non suivant les conditions de culture. Cette simplification a été écartée de prime abord.

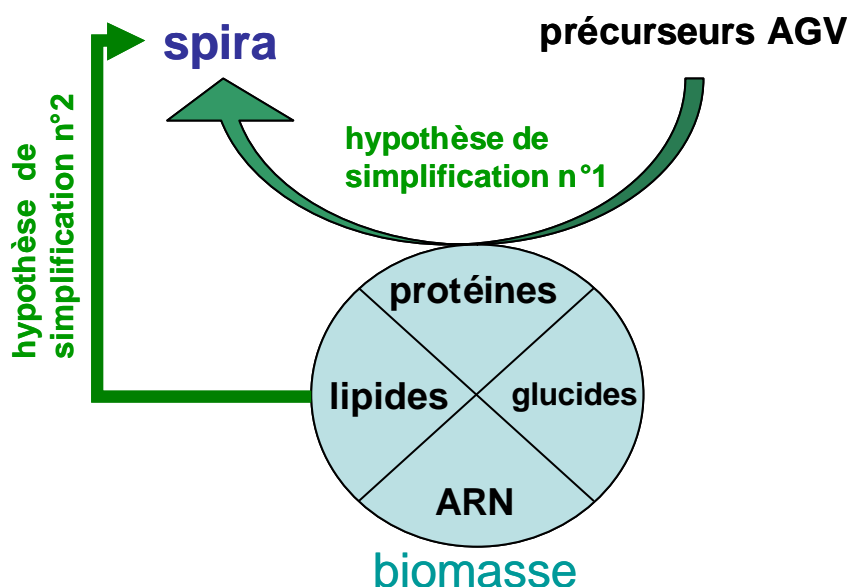
Le modèle représentant le métabolisme central de la bactérie nécessite la mesure d'un nombre réduit de vitesses accessibles en ligne lors d'une culture en fermenteur (cf. paragraphes III.B.2.a et III.B.2.b). Ainsi la structure de la biomasse peut-elle être décrite à l'aide de ce modèle en utilisant MFA. Il reste alors à définir un modèle phénoménologique qui relie la production de spiramycine à la structure de la biomasse décrite par le modèle stoechiométrique. D'après les données bibliographiques, deux hypothèses sont avancées :

- Les précurseurs du cycle de la spiramycine proviennent de l'activation d'acides gras à courtes chaînes (ou AGV). Khaoua et *al.* (1992) ont montré qu'un ajout exogène de ces AGV peut avoir un effet stimulateur sur la biosynthèse du macrolide. En déterminant une éventuelle corrélation cinétique entre la consommation des AGV présents dans le milieu de culture et la biosynthèse de la spiramycine catalysée par la biomasse, il serait alors possible de modéliser cette production d'antibiotique.
- Olukoshi et Packter (1994) ont formulé l'hypothèse que des réserves lipidiques (triacylglycérols) pourraient être une source de précurseurs pour la biosynthèse des antibiotiques. Par ailleurs, Schauner et *al.* (1999) ont mis en évidence l'importance des lipides intracellulaires sur la production de spiramycine. En supposant que cette biosynthèse est liée à la dynamique de formation et d'utilisation des réserves lipidiques, qui pourrait être décrite par le modèle stoechiométrique, il serait alors possible de modéliser la production de spiramycine en la reliant de manière phénoménologique à la structure de la biomasse.

Ces deux hypothèses simplificatrices sont illustrées par la figure III.E.2.1, la structure de la biomasse est décrite par le modèle MFA, et les flèches indiquent le lien phénoménologique supposé avec la biosynthèse de la spiramycine.



Afin de déterminer quelle hypothèse permet de décrire le phénomène étudié (la production de la spiramycine) ou laquelle des deux est la plus judicieuse à mettre en œuvre, il est nécessaire de réaliser une étude expérimentale de la biosynthèse de ce macrolide. Pour cela, la souche *S.ambofaciens* Sp181110 est cultivée à l'échelle pilote (fioles, fermenteur deux litres et fermenteur vingt litres).



**Fig. III.E.2.1 Hypothèses de simplification du modèle métabolique étudiées dans le cadre de cette étude**

Dans un premier temps, un milieu de culture chimiquement défini est calculé (cf. paragraphe II.A.2 du chapitre 2) puis validé en vérifiant que les dynamiques de croissance et de production sur ce milieu se rapprochent du procédé industriel et que les bilans matière sont vérifiés.

Puis pour étudier l'hypothèse de simplification n°1 (cf. fig.III.E.2.1), l'effet d'un ajout exogène de précurseurs qui alimentent la voie de biosynthèse est observé de manière à identifier une éventuelle corrélation stoechiométrique entre leur consommation et la production de l'antibiotique.

Enfin, pour étudier l'hypothèse simplificatrice n°2 (cf. fig.III.E.2.1), la production des AGV est minimisée par une conduite fed-batch et la production de spiramycine à partir des seules sources nutritionnelles endogènes est observée.

## Chapitre IV Etude expérimentale

### IV.A. Cultures Batch

#### IV.A.1. Définition et validation du milieu de culture

##### IV.A.1.a. Définition du milieu de culture

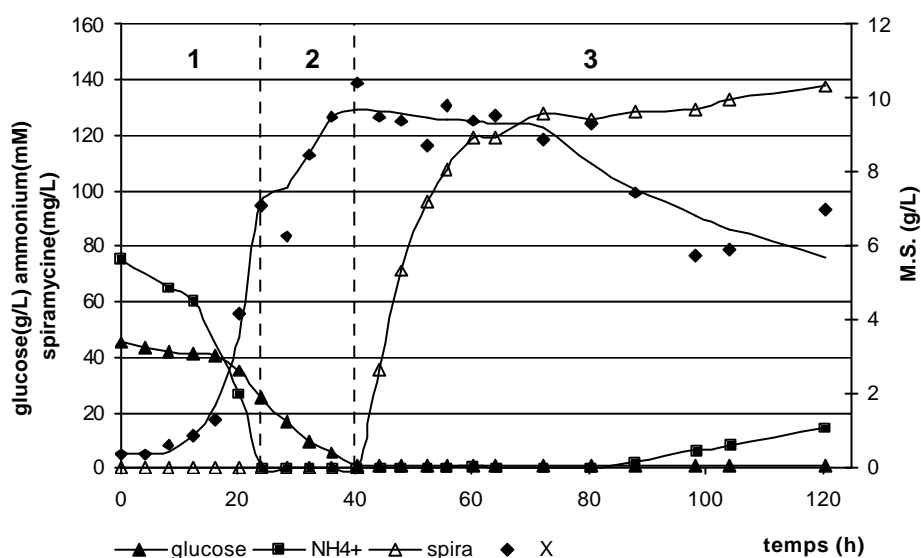
Le milieu de culture défini par une approche rationnelle basée sur les travaux d'Egli et Fiechter (1981 ; cf. paragraphe II.A.2. du chapitre II) a été validé par une culture en fermenteur à l'échelle du deux litres. Cette culture avait pour but d'observer la dynamique de croissance et de production de spiramycine dans le cas où le métabolisme secondaire est induit par une carence nutritionnelle en azote. Le milieu a été calculé de manière à reproduire des dynamiques proches de celles observées à l'échelle industrielle i.e. de mettre la souche de l'étude, qui est une souche modèle et non pas une souche optimisée pour la production d'antibiotique, dans les conditions de production. Les différentes phases qui ont été définies lors du calcul du milieu de culture sont les suivantes :

- Phase de croissance non limitée, donc en excès de glucose et de sels, jusqu'à la carence en azote. D'après le calcul du milieu de culture, l'épuisement de la source d'azote devrait être l'unique carence nutritionnelle au cours de la fermentation, tous les autres éléments étant en excès par rapport à la biomasse formée à partir de l'azote présent initialement.
- Phase en excès de glucose et en carence d'azote durant laquelle il devrait y avoir une augmentation de la concentration en matière sèche (M.S.) due à l'accumulation de polymères de réserves d'après les données bibliographiques [Martin et Demain (1980)].
- Phase stationnaire après épuisement du glucose lors de laquelle les réserves intracellulaires devraient être reconsommées en l'absence de sources de carbone exogène ce qui devrait provoquer une diminution de la M.S.

La production de spiramycine devrait vraisemblablement se situer durant la phase carencée en azote sans qu'il soit possible *a priori* de préciser quand, même si cette biosynthèse semble être inhibée par l'excès de glucose [Lounes et *al.* (1996)]. Il est vraisemblable qu'elle intervienne durant la phase stationnaire après l'épuisement du glucose ou pourrait débuter dans la phase précédente mais à une très faible vitesse.

#### IV.A.1.b. Résultats

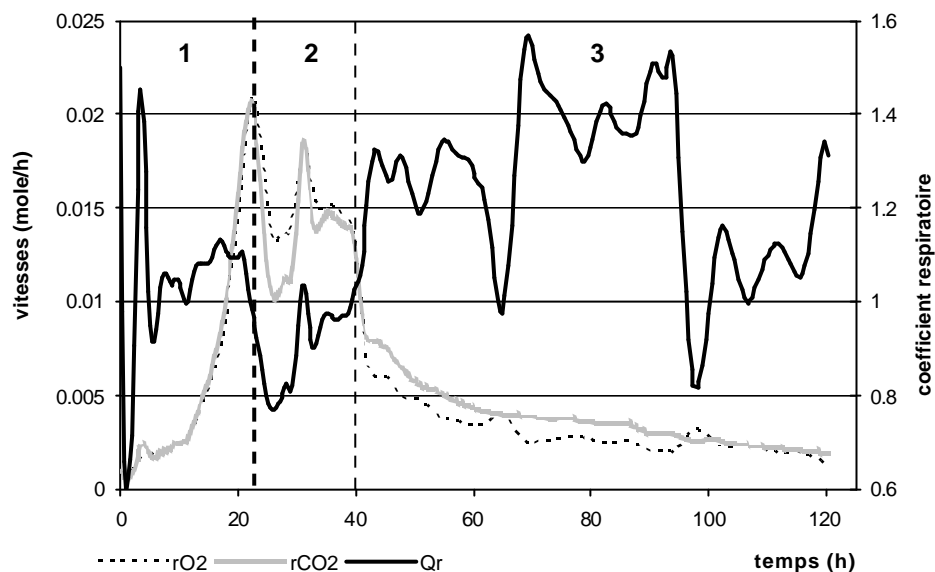
Le résultat de la culture est présenté sur la figure IV.A.1.b.1. Comme prévu par le calcul du milieu de culture, la fermentation se déroule en trois phases selon l'environnement nutritionnel de la bactérie.



**Fig. IV.A.1.b.1** Dynamique de croissance de *Streptomyces ambofaciens* et de production de spiramycine en culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude (1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)

La première phase est une phase de croissance non limitée, celle-ci est donc exponentielle avec un taux de croissance moyen proche de  $0,18 \text{ h}^{-1}$ . La carence en ions ammonium provoque la fin de la croissance exponentielle ainsi que probablement celle de la division cellulaire comme le souligne la chute brutale des vitesses de respiration en l'absence de modification du transfert gazeux (cf. figure IV.A.1.b.2). En effet, l'arrêt de la division cellulaire entraîne une diminution brutale de la demande énergétique et de la demande en carbone pour l'anabolisme ; par voie de conséquence, les vitesses de consommation d'oxygène et de production de  $\text{CO}_2$  qui sont principalement liées à cette activité

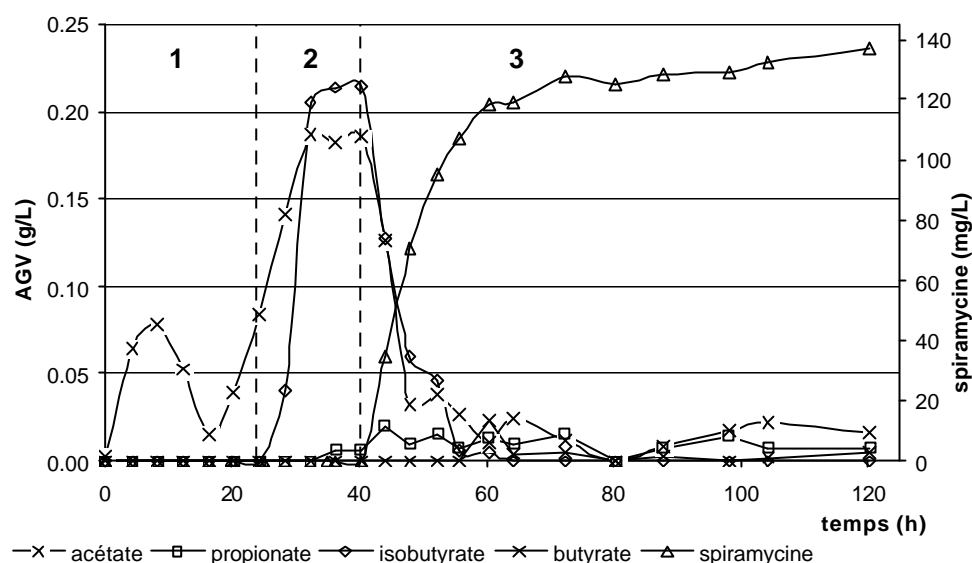
métabolique diminuent fortement peu avant 23 heures de culture. La concentration en biomasse est alors égale à  $7,2 \text{ g.L}^{-1}$ ; il est possible que cette concentration soit sous-estimée à cause de l'hétérogénéité du moût de fermentation qui fausse la mesure de la M.S. par filtration. Ce point devra être vérifié lors des fermentations suivantes ; le rendement de formation de biomasse à partir du glucose est faible ( $0,35 \text{ g.g}_{\text{glucose}}^{-1}$ ) ; le rendement théorique étant proche de  $0,5 \text{ g.g}_{\text{glucose}}^{-1}$  si la formation de biomasse à partir de l'oxydation du glucose est considérée.



**Fig. IV.A.1.b.2 Evolution des vitesses de respiration et du coefficient respiratoire en culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude (1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)**

Le glucose résiduel à la fin de la phase de croissance non limitée représente plus de 55% de la quantité initialement présente. La phase suivante est une phase de croissance linéaire (cf. évolution de la M.S.). Il est généralement admis qu'il s'agit d'une phase de croissance non répliquative résultant de l'accumulation de réserves intracellulaires [Martin et Demain (1980)]. Durant cette phase, deux acides gras volatils (AGV) sont principalement accumulés : acétate et isobutyrate (cf. figure IV.A.1.b.3). L'accumulation d'acétate débute en fin de phase exponentielle, ce qui peut expliquer que le rendement de formation de biomasse à partir du glucose soit relativement faible pendant cette dernière, tandis que celle d'isobutyrate débute en début de phase stationnaire ; l'excrétion d'AGV a par ailleurs déjà été

décrite dans la littérature [Khaoua et *al.* (1992)]. La vitesse de production de ces acides diminue significativement vers 32 heures de culture



**Fig. IV.A.1.b.3 Evolution des concentrations en produits de fermentation en culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude (1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)**

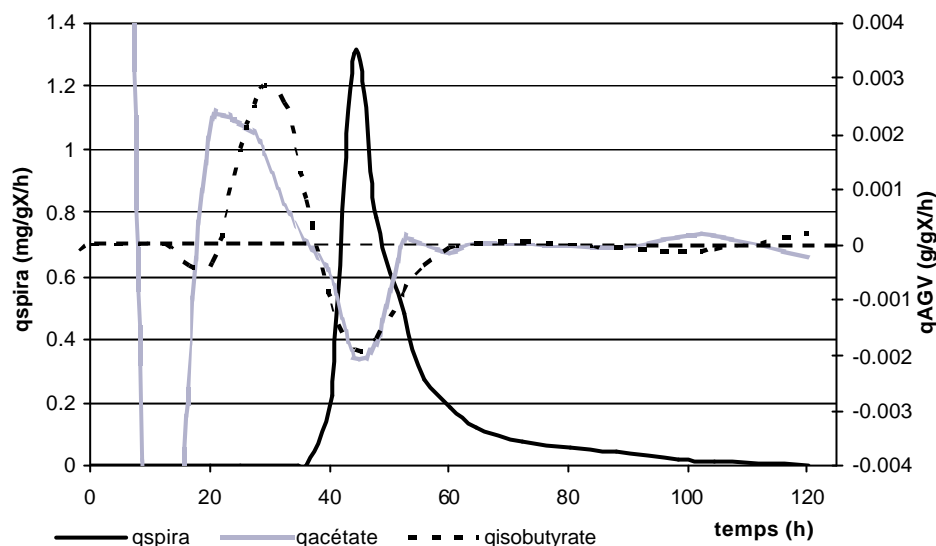
alors qu'une faible production de propionate débute. Entre 32 et 40 heures de culture, aucun phénomène significatif ne semble se dérouler si ce n'est l'augmentation de la M.S. Il est également observé durant cette phase que la vitesse de consommation d'oxygène est relativement constante au cours du temps (son évolution doit être interprétée en dehors de l'intervalle de temps vers 31 heures de culture pendant lequel la mesure a été perturbée) ; ceci est une caractéristique supplémentaire d'une évolution linéaire du système biologique. Le rendement de formation de biomasse à partir du glucose résiduel chute nettement au cours de cette période ( $0,1 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ ) ce qui peut être expliqué en partie par la formation des co-produits et par une consommation plus importante de substrat pour la maintenance. La fin de cette phase est marquée par l'épuisement du glucose présent dans le fermenteur (cf. figure IV.A.1.b.1), la chute brutale des vitesses de respiration (cf. figure IV.A.1.b.2) et la reconsommation des AGV (cf. figure IV.A.1.b.3).

Elle est suivie d'une phase stationnaire durant laquelle il n'est pas mesuré d'accumulation significative de biomasse (cf. figure IV.A.1.b.1) ; à partir de 50 heures de culture, les AGV sont quasiment

totallement reconsommés, ils représentent la seule source de carbone exogène lors de cette phase. La concentration en biomasse est maintenue jusqu'à environ 75 heures de fermentation avant de chuter de presque 40% par la suite. Il est donc probable qu'une source de carbone exogène non dosée se trouve dans le milieu de culture entre 50 et 75 heures de culture, ceci pourra être vérifié en calculant les bilans matière ; par ailleurs il est vraisemblable que la décroissance de la M.S. soit due à la lyse cellulaire ce qui libère du carbone. Les vitesses de respiration décroissent de manière monotone durant cette phase, reflétant l'arrêt progressif de l'activité métabolique de la biomasse et probablement l'accélération du décès cellulaire voire de la lyse précédemment évoquée.

La production de spiramycine débute à 40 heures de culture simultanément à l'épuisement du glucose. Elle ralentit fortement à 60 heures de fermentation et une deuxième phase de production significativement moins intense a alors lieu (15% d'antibiotique en plus est synthétisé lors de cette phase). La vitesse spécifique de production de spiramycine ramenée à la biomasse répliquative, i.e. la biomasse formée à l'épuisement de la source d'azote (notée  $X_n$ ), est égale à  $0,75 \text{ mg.g}_{X_n}^{-1}.\text{h}^{-1}$  pour la première phase et à  $0,02 \text{ mg.g}_{X_n}^{-1}.\text{h}^{-1}$  pour la deuxième phase. Peu avant le début de la production d'antibiotique, entre 28 et 30 heures de culture, un changement notable de couleur du milieu de culture a lieu ; le moût passe du jaune/orangé au mauve puis au marron et enfin au vert foncé. Ce phénomène pourrait être dû à la libération de pigments intracellulaires du fait du broyage des cellules par le mobile magnétique d'agitation utilisé dans le type de fermenteur mis en œuvre à cette échelle. La production d'antibiotique a par ailleurs lieu en parallèle de la reconsommation des AGV ; elle ralentit fortement peu après que l'acétate et l'isobutyrate ont été totalement consommés. Il semblerait donc qu'il existe une corrélation entre la consommation des précurseurs extracellulaires et la production de spiramycine. Ceci est illustré par l'évolution des vitesses spécifiques de production d'AGV et d'antibiotique au cours du temps, représentée sur la figure IV.A.1.b.4. Cette figure montre que les vitesses spécifiques de production d'acides sont négatives, indiquant une consommation de ceux-ci, lorsque la production de spiramycine démarre (vitesse spécifique de production strictement positive). La fin de la culture est marquée par une diminution très importante de la concentration en matière sèche qui débute entre 70 et 80 heures de culture. Il est probable que des réserves intracellulaires soient consommées sur cette période, car aucune source de carbone ne semble être présente en quantité

significative dans le milieu de culture. A partir de 88 heures de fermentation, des ions ammonium sont excrétés à vitesse constante ; leur concentration atteint près de 15 mM en fin de culture (cf. figure IV.A.1.b.1).



**Fig. IV.A.1.b4 Evolution des vitesses spécifiques de production d'acides (qacétate, qisobutyrate) et de spiramycine (qspira) en culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude**

#### IV.A.1.c. Bilans matière

Les bilans matière sont calculés selon la méthode présentée au paragraphe II.D.9.c. du chapitre II. Ces calculs de bilans matière ont été réalisés en prenant une formule élémentaire moyenne pour la biomasse :  $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,6}\text{N}_{0,2}$  et un pourcentage de cendres égal à 6 soit une masse molaire de  $28 \text{ g.Cmole}^{-1}$ . Le bilan carbone sur l'ensemble de la fermentation présente un déficit de 0,56 Cmole soit 25% du carbone présent initialement (cf. tableau IV.A.1.c.1). Lorsque les différentes phases sont étudiées, il apparaît que le bilan carbone est vérifié à 4% près pour la phase de croissance non limitée (0-20 heures, cf. tableau IV.A.1.c.2) ; en revanche il présente un déficit de 0,72 Cmole pour la phase linéaire (20-40 heures, cf. tableau IV.A.1.c.3) et des excédents de 0,15 et 0,09 Cmole respectivement pour la phase de production rapide d'antibiotique (40-72 heures, cf. tableau IV.A.1.C.4) et la fin de la culture (72-120 heures, cf. tableau IV.A.1.C.5). Un ou plusieurs composés non dosés sont donc produits lors de la phase linéaire de croissance, sans qu'il soit possible à ce stade de déterminer leur origine et leur rôle dans le métabolisme cellulaire ; une variation de la formule élémentaire de la biomasse due à

l'accumulation de substance de réserve ne peut seule expliquer le déficit de carbone calculé pendant cette phase.

Le calcul du bilan redox donne des résultats similaires. Ce bilan est vérifié pour la phase de croissance non limitée avec une précision comparable à celle du bilan carbone, il présente un déficit important pour la phase de croissance linéaire ainsi que de légers excédents pour la suite et la fin de la culture.

**Tab. IV.A.1.c.1 Bilan carbone pour la culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude**

<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>120</sub></b>	<b>Prélèvements</b>
Glucose : 64,37 g	Glucose : 0,63g	Glucose : 7,32g
Biomasse : 0,53 g	Biomasse : 7,97g	Biomasse : 3,74g
Acétate : 0,006 g	Acétate : 0,019g	Acétate : 0,034g
	Propionate : 0,009g	Propionate : 0,0059g
	Butyrate : 0,007g	Isobutyrate : 0,023g
	Spiramycine : 0,137g	Butyrate : 0,0011g
		Spiramycine : 0,033g
	CO <sub>2</sub> produit : 0,905 mol	
<b>Total : 2,16 Cmol</b>	<b>Total : 1,6 Cmol</b>	

**Tab. IV.A.1.c.2 Bilan carbone pour la phase de croissance non limitée de la culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude**

<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>20</sub></b>	<b>Prélèvements</b>
Glucose : 64,37 g	Glucose : 46,89g	Glucose : 5,71g
Biomasse : 0,53 g	Biomasse : 5,63g	Biomasse : 0,19g
Acétate : 0,006 g	Acétate : 0,054g	Acétate : 0,006g
	CO <sub>2</sub> produit : 0,114 mol	
<b>Total : 2,16 Cmol</b>	<b>Total : 2,08 Cmol</b>	



**Tab. IV.A.1.c.3 Bilan carbone pour la phase linéaire de la culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude**

<b>T<sub>20</sub></b>	<b>T<sub>40</sub></b>	<b>Prélèvements</b>
Glucose : 46,89g	Glucose : 1g	Glucose : 1,43g
Biomasse : 5,63g	Biomasse : 14,27g	Biomasse : 1,04g
Acétate : 0,054g	Acétate : 0,257g	Acétate : 0,022g
	Propionate : 0,008g	Propionate : 0,003g
	Isobutyrate : 0,295g	Isobutyrate : 0,017g
	CO2 produit depuis 20h : 0,403 mol	
<b>Total : 1,77 Cmol</b>	<b>Total : 1,05 Cmol</b>	

**Tab. IV.A.1.c.4 Bilan carbone pour la phase de production rapide d'antibiotique de la culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude**

<b>T<sub>40</sub></b>	<b>T<sub>72</sub></b>	<b>Prélèvements</b>
Glucose : 1g	Glucose : 0,7g	Glucose : 0,11g
Biomasse : 14,27g	Biomasse : 11g	Biomasse : 1,63g
Acétate : 0,257g	Acétate : 0,016g	Acétate : 0,004g
Propionate : 0,008g	Propionate : 0,019g	Propionate : 0,002 g
Isobutyrate : 0,295g	Butyrate : 0,006g	Isobutyrate : 0,006g
	Spiramycine : 0,128g	Butyrate : 0,0009 g
		Spiramycine : 0,017 g
	CO2 produit : 0,228 mol	
<b>Total : 0,57 Cmol</b>	<b>Total : 0,72 Cmol</b>	

**Tab. IV.A.1.c.5 Bilan carbone pour la fin de la culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude**

<b>T<sub>72</sub></b>	<b>T<sub>120</sub></b>	<b>Prélèvements</b>
Glucose : 0,7g	Glucose : 0,63g	Glucose : 0,07g
Biomasse : 11g	Biomasse : 7,97 g	Biomasse : 0,88 g
Acétate : 0,016g	Acétate : 0,019g	Acétate : 0,002g
Propionate : 0,019g	Propionate : 0,009g	Propionate : 0,0009 g
Butyrate : 0,006g	Butyrate : 0,007g	Butyrate : 0,0002g
Spiramycine : 0,128g	Spiramycine : 0,137g	Spiramycine : 0,016 g
	CO <sub>2</sub> produit depuis 72h : 0,16 mol	
<b>Total : 0,42 Cmol</b>	<b>Total : 0,51 Cmol</b>	

IV.A.2. Vérification des bilans matière sur l'ensemble de la fermentation et détermination du paramètre  $\frac{P}{O}$

#### IV.A.2.a. Objectifs

Dans le but de développer un modèle de type MFA, il est nécessaire de vérifier les bilans matière sur l'ensemble des phases de culture jusqu'à la fin de la production d'antibiotique. En effet, ce type de modélisation est basé sur la loi de conservation de la matière et le modèle doit donc intégrer toutes les conversions significatives de métabolites. Au paragraphe IV.A.1.c., il a été mis en évidence qu'une quantité significative de métabolite(s) extracellulaire(s) n'a pas été prise en compte lors de la phase de croissance linéaire.

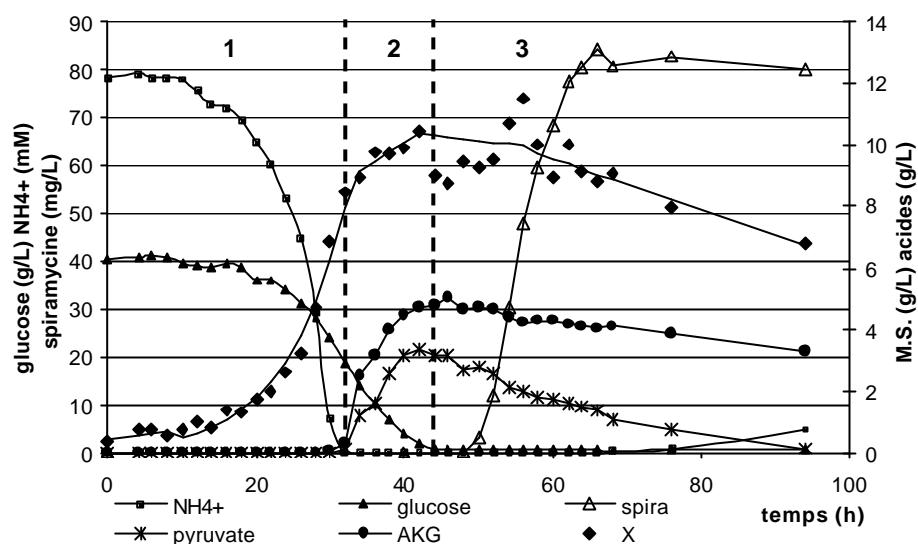
La même culture a été reproduite à l'échelle du vingt litres, de manière à avoir des flux de matière un ordre de grandeur plus élevé ce qui rend les analyses macroscopiques plus précises. Des produits organiques non volatils ont été recherchés par HPLC, ce qui n'avait pas été le cas à l'échelle du deux litres. En effet, les données bibliographiques [Kannan et Rehacek (1970), Surowitz et Pfister (1985), Madden et *al.* (1996)] indiquent que les Streptomycètes produisent des acides organiques non volatils

tels que le pyruvate ou l' $\alpha$ -cétooglutarate (AKG) mais de telles productions n'ont pas été signalées dans les études sur *S.ambofaciens*.

#### IV.A.2.b. Résultats

Le résultat de la fermentation est présenté sur la figure IV.A.2.b.1. Il apparaît que les trois phases identifiées à l'échelle du deux litres ont également eu lieu : phase exponentielle de croissance non limitée en excès de glucose, phase de croissance linéaire après carence en azote et en excès de glucose et phase stationnaire après la carence en glucose. L'analyse HPLC révèle une production importante de pyruvate et d'AKG suite à l'épuisement des ions ammonium, la concentration totale en acides atteignant près de  $8 \text{ g.L}^{-1}$ . Ces deux acides sont reconsommés suite à l'épuisement du glucose résiduel, le pyruvate en totalité et l'AKG partiellement. Ce dernier représente donc une source de carbone exogène disponible jusqu'à la fin de la culture. Toutefois, l'évolution de la M.S. met en évidence une décroissance pendant la phase carencée en glucose ce qui suppose que des polymères de réserves sont également consommés ; les acides produits seraient donc insuffisants pour maintenir durablement la souche après l'épuisement du glucose. Par ailleurs, il n'a pas été constaté de changement notable de couleur après la carence en azote contrairement à ce qui s'est produit à l'échelle du deux litres. Le changement de couleur observé dans ce précédent cas serait donc spécifique d'un stress mécanique. Cependant, en phase stationnaire, la couleur du moût de fermentation s'assombrit progressivement reflétant peut être la lyse progressive d'une partie de la biomasse ; l'observation au microscope de la morphologie de la culture à ce stade met en évidence une fragmentation importante du mycélium.

La phase de latence de huit heures est accidentelle, causée par un transfert tardif de la pré-culture dans le fermenteur. La phase exponentielle est caractérisée par un taux de croissance qui peut être calculé à partir du lissage de la courbe de biomasse ( $0,13 \text{ h}^{-1}$ ), de la vitesse de production de  $\text{CO}_2$  ( $0,14 \text{ h}^{-1}$ ), de l'évolution du glucose consommé ( $0,15 \text{ h}^{-1}$ ) ou de l'évolution de l'azote consommé ( $0,16 \text{ h}^{-1}$ ), soit un taux de croissance moyen de  $0,15 \text{ h}^{-1}$  plus faible qu'à l'échelle du deux litres. Le rendement en biomasse est égal à  $0,37 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$  sur cette phase soit une valeur comparable à celle déterminée à l'échelle du deux litres.  $8,5 \text{ g.L}^{-1}$  de biomasse sont formés lorsqu'intervient la carence en azote, soit un écart de plus de 15% avec la valeur mesurée à l'échelle du deux litres.

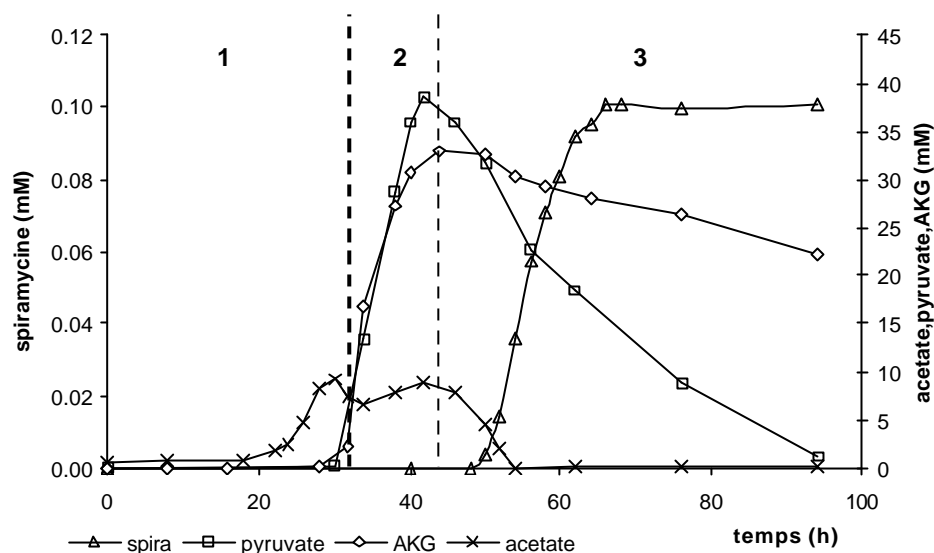


**Fig. IV.A.2.b.1** Dynamique de croissance et de production de spiramycine en culture batch sur le milieu synthétique à l'échelle du vingt litres (1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)

La phase linéaire est caractérisée par un rendement de formation de biomasse à partir du glucose égal à  $0,11 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$  identique à celui calculée à l'échelle du deux litres ; il est déduit que les mêmes acides organiques ont été également produits à cette échelle.

La production de spiramycine débute environ six heures après l'épuisement du glucose et se déroule en une seule phase, contrairement à ce qui avait été observé à l'échelle du deux litres. De même, la vitesse spécifique de production d'antibiotique ( $0,55 \text{ mg} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) est 25% inférieure ; il est probable que le cisaillement important mis en évidence à l'échelle du deux litres ait joué un rôle dans les différences observées sur la dynamique du métabolisme secondaire dans ces deux cultures.

A l'échelle du vingt litres, l'acétate est l'unique AGV produit en quantité significative durant la phase exponentielle (cf. figure IV.A.2.b.2). Cette figure met en évidence le fait qu'il ne semble pas exister de corrélation cinétique évidente entre la production du macrolide et la consommation des différents acides organiques ; de plus il apparaît manifestement que le pyruvate et l'AKG continuent à être consommés aux mêmes vitesses après 65 heures de culture malgré l'arrêt de la production de spiramycine. En terme de quantité de matière, la production d'antibiotique est 88 à 385 fois plus faible que les consommations respectives de l'acétate, du pyruvate et de l'AKG .



**Fig. IV.A.2.b2 Dynamique de production d'acides organiques et de spiramycine en culture batch sur le milieu synthétique à l'échelle du vingt litres (1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)**

En phase stationnaire, les cinétiques de consommation des trois acides majoritaires (pyruvate, AKG et acétate) diffèrent de façon significative. Afin de déterminer la consommation globale de carbone pendant cette phase, la technique de réconciliation des données [Cailler (1994)] a été mise en œuvre. Le calcul fait apparaître une consommation spécifique de carbone égale à  $8.10^{-4} \text{ C mole.g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Elle peut être considérée comme un flux global de carbone, noté par la suite  $\Phi_{sp}$ , pour la maintenance du microorganisme pendant la totalité de la phase stationnaire de la culture.

#### IV.A.2.c. Bilans matière

Le calcul des bilans matière montre que le bilan carbone est vérifié à 8% près sur l'ensemble de la fermentation, à 4% près pour la phase de croissance non limitée, à 7% près pour la phase linéaire et qu'il est exactement vérifié pour la phase de production de spiramycine. Le bilan redox est vérifié avec une précision du même ordre sur l'ensemble de la fermentation et sur les différentes phases. Les flux significatifs d'échanges de métabolites pour la culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude sont donc à présent caractérisés. Par ailleurs, les dynamiques de croissance et de production sont globalement reproductibles entre les deux échelles expérimentées. Pour une

meilleure précision des données expérimentales, il semble à ce stade préférable de travailler à l'échelle du vingt litres.

#### IV.A.2.d. Détermination du paramètre $\frac{P}{O}$

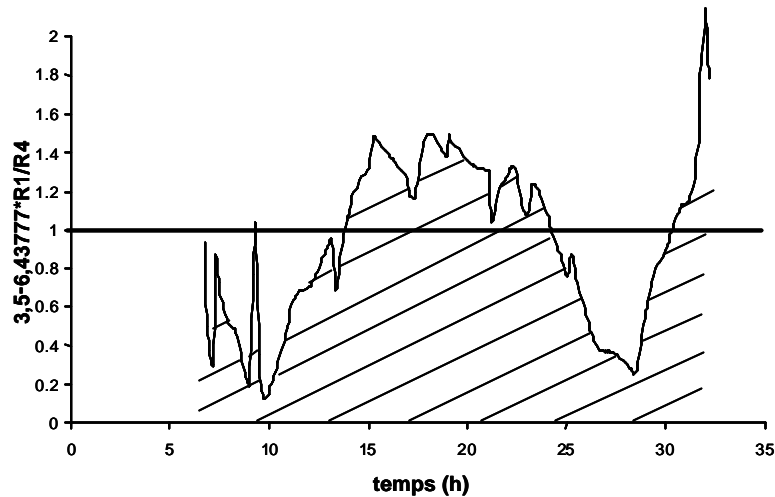
Les données expérimentales recueillies permettent de déterminer un intervalle de valeurs acceptables pour le rapport de phosphorylation oxydative  $\frac{P}{O}$  apparaissant dans le modèle stoechiométrique. La stratégie utilisée est de résoudre le système d'équations de flux décrit au paragraphe III.B.2.a. en fixant les vitesses spécifiques de consommation de glucose ( $q_s$ ), d'oxygène ( $q_{O_2}$ ) et de production de  $CO_2$  ( $q_{CO_2}$ ) et ainsi de calculer les vitesses intracellulaires sous forme symbolique. Ensuite, des contraintes biochimiques (signes des vitesses des réactions PEP  $\rightarrow$  pyruvate, référencée  $r_6$  dans le modèle stoechiométrique, et pyruvate  $\rightarrow$  acétylCoA, référencée  $r_7$  dans le modèle stoechiométrique) et une contrainte métabolique (coefficient respiratoire égal à 1 en croissance sur glucose) sont définies. En fixant une valeur pour le rapport de phosphorylation oxydative et en utilisant les valeurs nominales des autres paramètres, il est possible d'exprimer  $r_6$  et  $r_7$  uniquement en fonction des vitesses fixées pour le calcul des flux. Par exemple, pour une valeur de  $\frac{P}{O}$  égale à 2, on obtient :

$$r_7 = \frac{9}{7}|R_1| + 0,199 \times |R_3| - 0,699 \times |R_4|$$

Avec  $R_1 = q_s$ ,  $R_3 = q_{CO_2}$  et  $R_4 = q_{O_2}$ . En imposant  $r_7$  strictement positive, il vient :

$$Qr > 3,5 - 6,43777 \times \frac{|R_1|}{|R_4|}$$

En utilisant les valeurs expérimentales mesurées à l'échelle du vingt litres, il est possible de tracer cette inégalité au cours du temps (cf. figure IV.A.2.d.1). Les valeurs du coefficient respiratoire ne peuvent se situer dans la zone hachurée pour qu'elle soit satisfaite. En croissance sur glucose avec formation d'un produit de même degré de réduction que ce substrat (l'acétate), le  $Qr$  est théoriquement égal à 1 ce qui est représenté par une droite horizontale sur la figure IV.A.2.d.1.



**Fig. IV.A.2.d.1 Borne inférieure du coefficient respiratoire pour satisfaire les contraintes biochimiques**

Il apparaît que pour une valeur de  $\frac{P}{O}$  égale à 2, il existe un intervalle de temps entre 14 et 22 heures pendant lequel le signe de  $r_7$  ne peut être strictement positif, en désaccord avec les données biologiques.

En répétant ce type d'analyse des signes des vitesses  $r_6$  et  $r_7$  pour différentes valeurs de  $\frac{P}{O}$ , il apparaît que les valeurs de ce paramètre doivent être comprises entre 0 et 0,55 pour avoir une distribution des flux acceptable au regard des données thermodynamiques. La valeur supérieure a été choisie comme valeur nominale pour le rapport de phosphorylation oxydative dans la suite de cette étude :  $\frac{P}{O} = 0,55$ .

Il est important de garder à l'esprit qu'il ne s'agit évidemment pas d'une réalité biologique (nombre de proton exporté par molécule d'ATP produite) mais du paramétrage du modèle utilisé pour représenter le métabolisme central de *S.ambofaciens*.

#### IV.A.3. Etude de la corrélation entre la consommation des acides gras volatils et la production de spiramycine

##### IV.A.3.a. Objectifs

Afin de confirmer ou d'infirmer une absence de corrélation cinétique entre la consommation des acides gras à courtes chaînes (ou AGV) et la production de spiramycine dans nos conditions de

culture, une seconde culture batch à l'échelle du vingt litres a été réalisée. Le premier objectif était de raccourcir la durée de la phase linéaire de croissance en augmentant la concentration initiale en ions ammonium (de 80 à 120 mM) tout en conservant la même concentration initiale en glucose ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ ), ceci afin de limiter le phénomène d'overflow donc de produire une quantité moins importante de pyruvate et d'AKG. Le second objectif était de faire des AGV la source principale de carbone exogène au début de la phase de production d'antibiotique en réalisant un ajout d'acétate et d'isobutyrate peu avant cette dernière. Lors de la précédente culture, la biosynthèse du macrolide a débuté 18 heures après la carence en azote ; en supposant que cette unique carence nutritionnelle détermine le début de la phase de production, le pulse d'AGV a été réalisé 18 heures après l'épuisement des ions ammonium. La concentration en AGV après le pulse a été fixée à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  pour chaque acide, soit une concentration cinq fois supérieure à leur concentration en fin de phase linéaire à l'échelle du deux litres (cf. paragraphe IV.A.1.b.).

#### IV.A.3.b. Résultats

La figure IV.A.3.b.1 présente les résultats obtenus. En optimisant l'âge de la pré-culture avant le transfert dans le fermenteur, il a été possible de diminuer la durée de la phase de latence. La phase exponentielle est caractérisée par un taux de croissance moyen égal à  $0,16 \text{ h}^{-1}$  et un rendement de  $0,38 \text{ g}_{\text{X}} \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ . Ce rendement chute à  $0,12 \text{ g}_{\text{X}} \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$  lors de la phase linéaire dont la durée a été réduite de huit heures. La quantité d'acides organiques produits lors de cette phase a pu être divisée par deux ( $4 \text{ g.L}^{-1}$  contre  $8 \text{ g.L}^{-1}$ ). Le premier ajout d'AGV a été effectué lors de la phase stationnaire à 46 heures de culture alors que le pyruvate a été totalement reconstitué (cf. figure IV.A.3.b.2). Les AGV représentent  $0,075 \text{ C.mole.L}^{-1}$  et l'AKG  $0,05 \text{ C.mole.L}^{-1}$ . Les premiers sont donc la source principale de carbone exogène. Un deuxième pulse d'isobutyrate uniquement (en doublant la concentration dans le bioréacteur) a été effectué lorsque les acides ajoutés lors du premier pulse ont été totalement consommés.



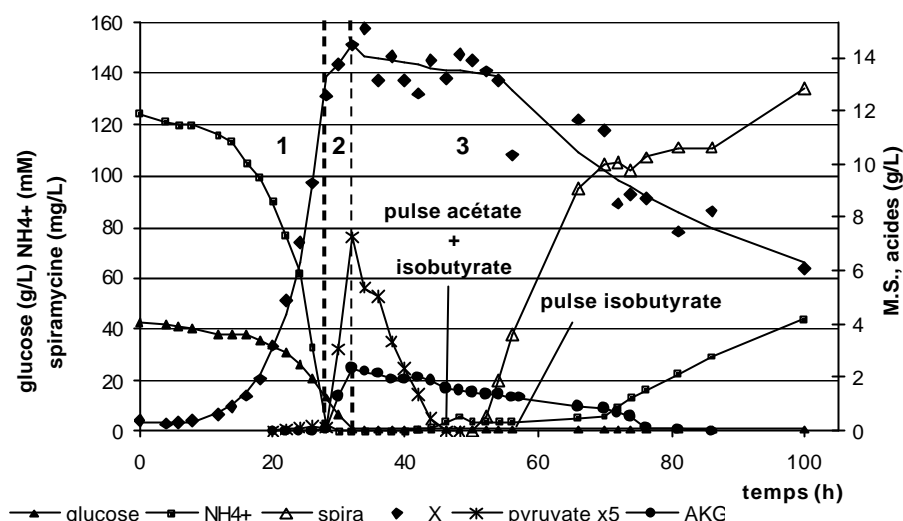


Fig. IV.A.3.b.1 Effet d'un pulse d'AGV sur la production de spiramycine en culture batch sur le milieu synthétique à l'échelle du vingt litres (1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)

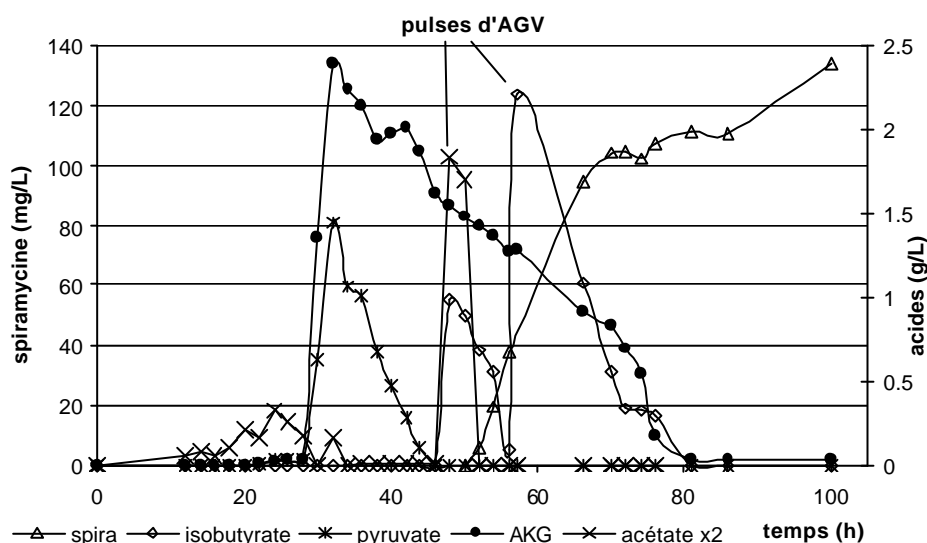


Fig. IV.A.3.b.2 Dynamique de production et de consommation des acides organiques et de spiramycine en culture batch sur le milieu synthétique à l'échelle du vingt litres

La production de spiramycine débute entre 50 et 52 heures de culture soit légèrement plus tardivement par rapport à la carence en azote par rapport à la fermentation présentée au paragraphe IV.A.2. (délai de 20 heures contre 18 heures). Elle se déroule en deux phases, une première phase de production rapide caractérisée par une vitesse spécifique égale à  $0,39 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  et une seconde phase pendant laquelle 20% d'antibiotique en plus est produit avec une vitesse spécifique égale à  $0,08 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Il

apparaît de cette façon qu'il n'y a pas de corrélation cinétique directe entre la consommation des AGV (acétate et isobutyrate) et la production de spiramycine (cf. tableau IV.A.3.b.1). En effet, les vitesses spécifiques de consommation d'isobutyrate et d'acétate ont été augmentées respectivement d'un facteur 5 à 7 du fait du premier pulse sans effet positif sur la vitesse spécifique de production d'antibiotique ; au contraire cette dernière est plus faible. La première hypothèse de simplification de la structure du modèle, qui considérerait qu'il existe une corrélation cinétique entre la consommation de précurseurs exogènes et la production de l'antibiotique, n'est donc pas vérifiée dans les conditions expérimentales mises en œuvre.

**Tab. IV.A.3.b.1 Vitesses spécifiques de consommation d'AGV et de production de spiramycine en culture Batch sur le milieu synthétique**

<b>données cinétiques</b> / <b>culture</b>	<b>Batch n°1 (échelle 2L)</b>	<b>Batch n°2 (échelle 20L)</b>
Vitesse spécifique de consommation d'acétate ( $\text{mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	0,0026	0,019
Vitesse spécifique de consommation d'isobutyrate ( $\text{mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	0,0018	0,009
Vitesse spécifique de production de spiramycine ( $\text{mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	0,75	0,39

Par ailleurs, la concentration en matière sèche (M.S.) diminue à partir du début de la phase de production d'antibiotique. La M.S. finale représente moins de la moitié de la M.S. en début de phase stationnaire, il est donc probable que des réserves intracellulaires sont consommées lors de la phase de production de spiramycine. De plus, des ions ammonium sont excrétés entre 70 et 80 heures de fermentation et accumulés dans le milieu de culture pour atteindre une concentration égale à 44 mM.

La seconde hypothèse de simplification de la structure du modèle, qui considère que la spiramycine est produite à partir des sources de carbone endogène, doit être étudiée en reproduisant la même dynamique de croissance et de production d'antibiotique tout en minimisant la production d'acide lors de la phase de croissance (exponentielle et linéaire). Le mélange d'acides organiques présent dans le milieu de culture lors de la phase stationnaire des cultures batch est une source de carbone

relativement complexe qui devra être remplacée de manière adéquate par le glucose. Par ailleurs leurs degrés de réduction étant proches (3,2 et 3,33), il est peu probable que le modèle stœchiométrique qui est basé sur les bilans matière puisse distinguer des flux provenant de composés aux caractéristiques aussi proches.

## IV.B. Cultures Fed-batch

### IV.B.1. Nécessité d'intégrer une source de carbone exogène au modèle ?

Les cultures Batch font apparaître qu'il est probable que des réserves intracellulaires sont consommées pendant la phase stationnaire lors de la production de la spiramycine. Afin de déterminer si ce macrolide peut être produit uniquement à partir des sources endogènes de carbone et d'azote, une culture Fed-batch a été mise en œuvre en utilisant la conduite définie au paragraphe II.C. du chapitre II (conduite Fed-batch n°1). Cette dernière vise à minimiser la production d'acides organiques pendant la phase de croissance de manière à ce que le glucose soit l'unique source de carbone exogène disponible.

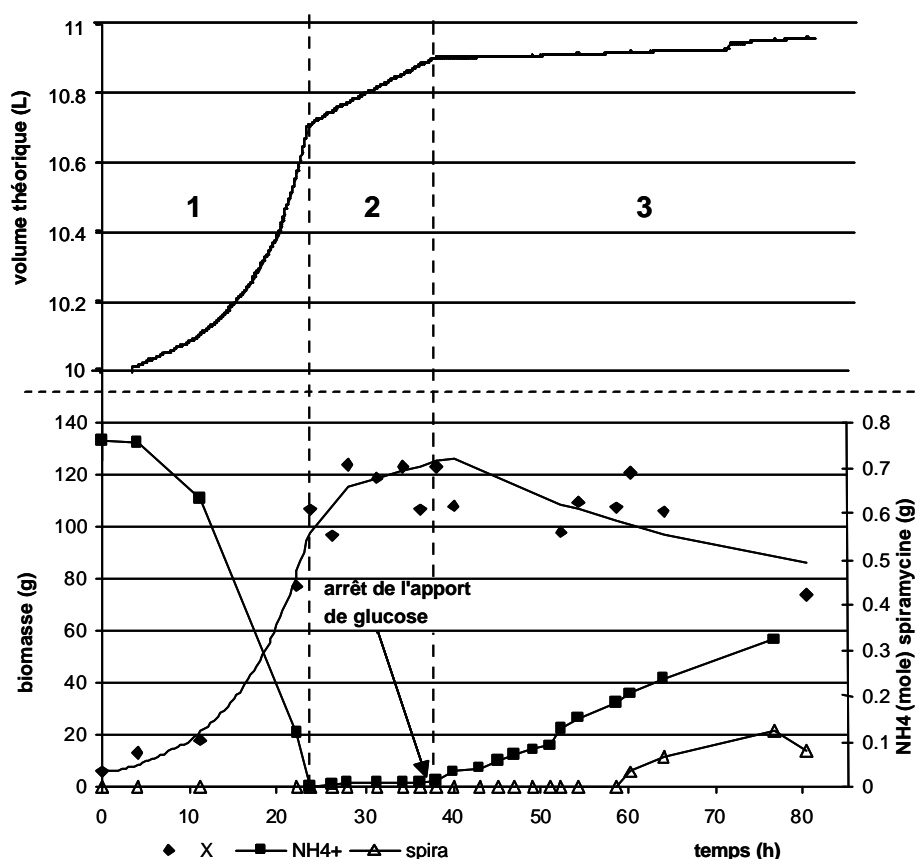
Cette conduite en limitation de substrat (le glucose résiduel est toujours nul) permet d'assurer une croissance exponentielle jusqu'à l'épuisement de la source d'azote, puis une phase de croissance linéaire pendant laquelle des substances de réserves carbonées peuvent être accumulés dans une proportion similaire à ce qui a été observé lors de la culture Batch présentée au paragraphe IV.A.2. (environ 15% de matière sèche supplémentaire est accumulée dans ce cas entre la carence en azote et la phase stationnaire). Une fois ces substances de réserves accumulées, l'alimentation en glucose est stoppée pour définir la phase stationnaire ; la culture est donc carencée en carbone exogène.

Le résultat est présenté sur la figure IV.B.1.1. Les variables sont calculées en masse de manière à s'affranchir de l'effet de dilution dû à l'apport de substrat et le volume théorique calculé est reporté afin de pouvoir calculer les concentrations des différentes espèces. Lors de la phase exponentielle, la concentration maximale en AGV est proche de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  (contre  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  en culture Batch) alors que celle en acides non volatils (ou ANV, pyruvate et AKG) est nulle. En phase linéaire, la concentration

maximale en acides est inférieure à  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  (alors qu'elle atteint  $8 \text{ g.L}^{-1}$  en culture batch), la conduite a donc permis d'imposer une limitation en carbone qui minimise la production d'acides organiques.

La phase exponentielle est caractérisée par un taux de croissance égal à  $0,12 \text{ h}^{-1}$  et un rendement de  $0,52 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ , une valeur plus élevée que celles mesurées en culture Batch par élimination de la production de co-métabolites (ce qui confirme *a posteriori* l'hypothèse avancée pour expliquer la faiblesse du rendement en batch) ; le rendement global sur l'ensemble de la phase de croissance (phase exponentielle + phase linéaire) est égal à  $0,45 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ .

Dès l'arrêt de l'apport de glucose, entraînant une carence en carbone exogène, une accumulation continue d'ions ammonium intervient et la concentration finale atteint  $30 \text{ mM}$ . En parallèle, la



**Fig. IV.B.1.1** Dynamique de croissance et de production de spiramycine en culture Fed-batch sur le milieu synthétique à l'échelle du vingt litres (1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)

M.S. a tendance à diminuer même si les points expérimentaux sont relativement dispersés. Il semble dans ce cas que les protéines sont la source nutritionnelle endogène prioritaire pour fournir le carbone et l'énergie nécessaires à l'activité métabolique, la protéolyse libérant des acides aminés dont la partie

carbonée est consommée et leurs déaminations entraînant un relargage d'ions ammonium. Ce phénomène sera appelé par la suite "protéolyse".

La production de spiramycine démarre environ 33 heures après la carence en azote et semble soumise à l'effet inhibiteur des ions ammonium. Le titre maximal est de  $11 \text{ mg.L}^{-1}$  soit une valeur 8 à 10 fois plus faible que les concentrations atteintes en culture Batch ; de même la vitesse spécifique de production est égale à  $0,056 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  soit une valeur d'un ordre de grandeur plus faible par rapport à celles mesurées en culture Batch.

D'après les résultats de cette fermentation, il apparaît que le modèle doit être développé dans des conditions intégrant la présence de sources de carbone à la fois endogènes et exogène ; en effet, dans le cas où il n'y a pas de source de carbone exogène, la culture évolue vers des conditions dans lesquelles la production d'antibiotique est fortement inhibée. Il est également nécessaire de déterminer si le substrat exogène amené de façon contrôlée a une influence sur la biosynthèse de la spiramycine.

#### IV.B.2. Impact de la source de carbone exogène dans le modèle

##### IV.B.2.a. Définition des cultures Fed-batch

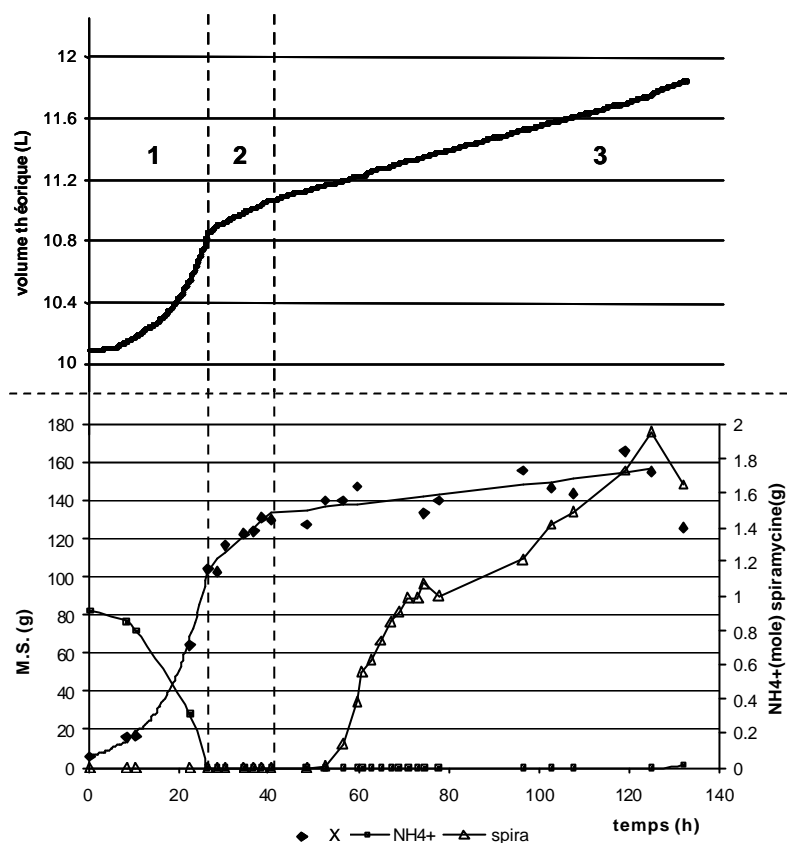
Afin d'étudier l'effet de la source de carbone exogène sur cette biosynthèse, trois cultures Fed-batch ont été mises en œuvre afin de déterminer l'impact du flux glycolytique en carence azote sur l'induction de la production et sur la production elle-même. Elles diffèrent donc par l'apport de glucose lors de la phase stationnaire. Dans la culture Fed-batch n°1, le flux global de carbone  $\Phi_{\text{sp}}$  cité à la fin du paragraphe IV.A.2.b. est converti en équivalent glucose ( $\text{g}_{\text{glucose}}.\text{h}^{-1}$ ) et appliqué pendant la totalité de la phase stationnaire ; dans la culture Fed-batch n°2, un flux de glucose 1,5 fois plus élevé par rapport à celui de la culture Fed-batch n°1 est appliqué ; dans la culture Fed-batch n°3, un flux égal à celui de la culture Fed-batch n°1 est appliqué jusqu'au début de la production de spiramycine puis le flux est annulé en stoppant l'apport de glucose jusqu'à la fin de la fermentation.

#### IV.B.2.b. Résultats

##### IV.B.2.b.1. Culture Fed-batch n°1

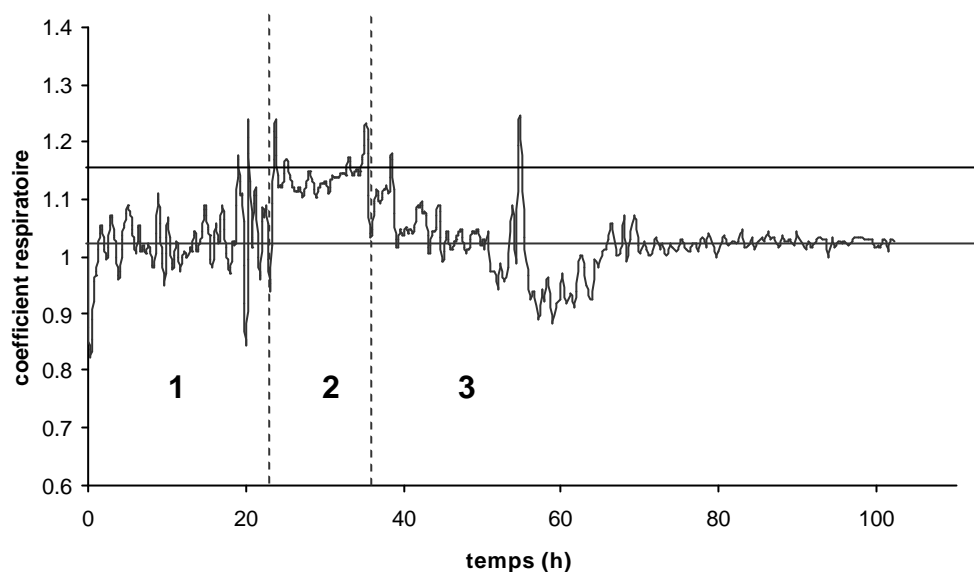
Le résultat de la culture Fed-batch n°1, ou culture de référence, est présenté sur la figure IV.B.2.b.1.1. La dynamique de la phase de croissance est identique à la culture Fed-batch présentée au paragraphe IV.B.1., ses caractéristiques (taux de croissance, rendement de formation de biomasse à partir du glucose) sont résumés dans le tableau IV.B.4.b.1 à la fin de ce chapitre. Les co-produits acides sont présents en quantité négligeable (concentration inférieure à  $0.05 \text{ g.L}^{-1}$ ) au début de la phase stationnaire de la culture.

Lors de cette dernière phase, aucune accumulation de glucose n'a été relevée ; de même aucune accumulation d'ions ammonium n'a été mesurée contrairement au cas de la culture Fed-batch présentée au paragraphe IV.B.1., ce qui signifie que l'apport limitant de glucose permet d'éviter que les protéines soient utilisées comme source de carbone et d'énergie. Par ailleurs, une accumulation non négligeable de M.S. est mesurée jusqu'à la fin de la fermentation. Il y a donc une activité anabolique pendant cette phase stationnaire due à l'apport limitant de glucose, ce dernier permettrait donc de poursuivre la synthèse des réserves intracellulaires.



**Fig. IV.B.2.b.1.1** Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la culture Fed-batch n°1  
(1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)

La production de spiramycine débute pendant la phase stationnaire à 54 heures de fermentation soit 28 heures après la carence en azote. Elle se déroule en deux phases comme observé aux paragraphes IV.A.1.b. et IV.A.3.b., une phase de production rapide caractérisée par une vitesse spécifique égale à  $0,52 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  et une concentration finale proche de  $90 \text{ mg.L}^{-1}$ , soit des valeurs proches de celles mesurées en culture Batch à l'échelle du vingt litres, et une phase de production moins intense caractérisée par une vitesse spécifique égale à  $0,17 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Le métabolisme secondaire a donc lieu en présence d'un flux glycolytique permettant une activité anabolique.



**Fig. IV.B.2.b.1.2 Evolution du coefficient respiratoire pour une culture Fed-batch (1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)**

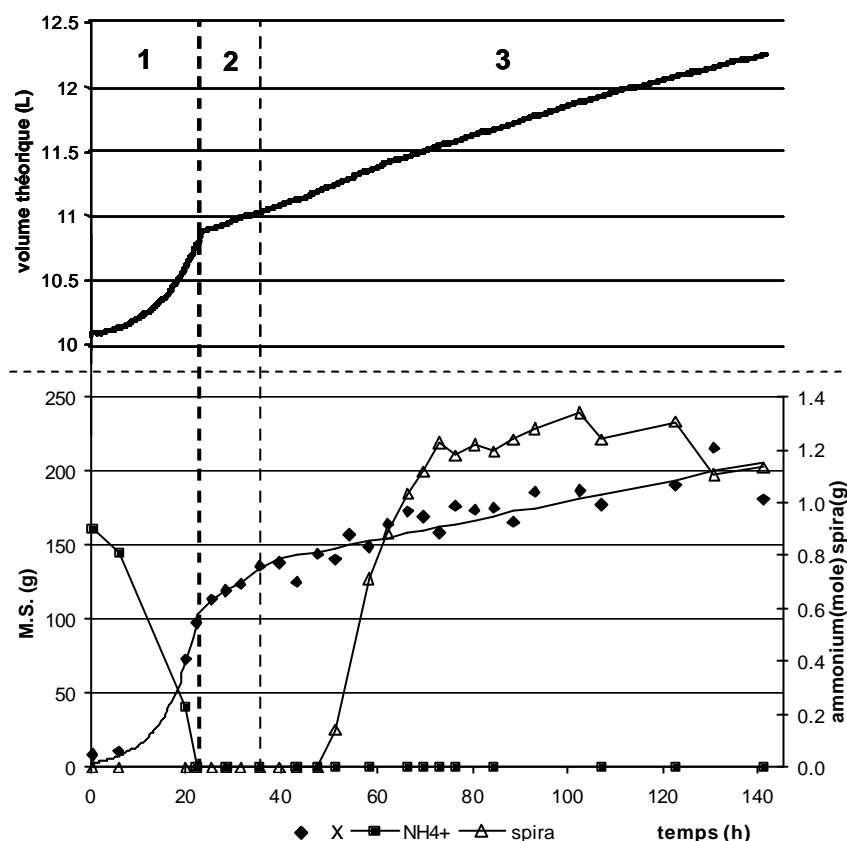
L'évolution du coefficient respiratoire ( $Q_r$ ) jusqu'à la fin de la première phase de production (100 heures de culture) est présentée sur la figure IV.B.2.b.1.2. Il apparaît que la valeur moyenne du  $Q_r$  est égal à 1 en phase exponentielle, ce qui est conforme à la théorie pour une croissance sur glucose sans formation de co-produits [Roels (1983)]. Le  $Q_r$  a une valeur moyenne égale à 1,15 durant toute la durée de la phase linéaire de croissance ce qui peut être lié à la formation de produits plus réduits que la biomasse [Roels (1983)], par exemple des réserves lipidiques conformément à ce qui a été mis en évidence par Olukoshi et Packter (1994) pour d'autres souches de *Streptomyces*. En phase stationnaire, le coefficient respiratoire décroît jusqu'à 1. Un pic important a été observé alors que se produisait une chute brutale de la concentration en oxygène dissous de 83 à 57% (sans modification du transfert) et le déclenchement de la pompe d'ajout de base pour réguler le pH. Pendant la phase de production rapide de spiramycine, le  $Q_r$  est nettement inférieur à 1 ce qui peut être lié à la consommation de réserves intracellulaires comme les lipides. En fin de culture, le  $Q_r$  est de nouveau égal à 1.

Le calcul des bilans matière montre qu'ils sont vérifiés avec une précision comprise entre 1,5 et 8 % pour les différentes phases de la fermentation.



#### IV.B.2.b.2. Culture Fed-batch n°2

Le résultat de la culture Fed-batch n°2 est présenté sur la figure IV.B.2.b.2.1. La dynamique de la phase de croissance est similaire à la culture Fed-batch n°1, ou culture de référence, ses caractéristiques sont résumées dans le tableau IV.B.4.b.1. La limitation en carbone ayant été moins importante, la quantité d'acides produits en début de phase linéaire a été plus importante (entre 0,2 et 0,3 g.L<sup>-1</sup>) mais ils ont été totalement reconsommés en début de phase stationnaire.



**Fig. IV.B.2.b.2.1 Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la culture Fed-batch n°2**

**(1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)**

Pendant la phase stationnaire, un flux de glucose 1,5 fois plus élevé que celui apporté dans le cas de la culture de référence a pu être imposé sans accumuler de glucose ni de co-produits acides. Dans ces conditions, la production de spiramycine débute pendant la phase stationnaire à 49 heures de fermentation soit 27 heures après la carence nutritionnelle. Contrairement à la culture de référence, une deuxième phase de production moins rapide n'apparaît pas clairement. Il est possible de considérer que la phase de production se situe entre 49 et 75 heures de culture, elle est alors caractérisée par une vitesse spécifique égale à 0,5 mg.g<sub>Xn</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> et une concentration finale de 105 mg.L<sup>-1</sup>.

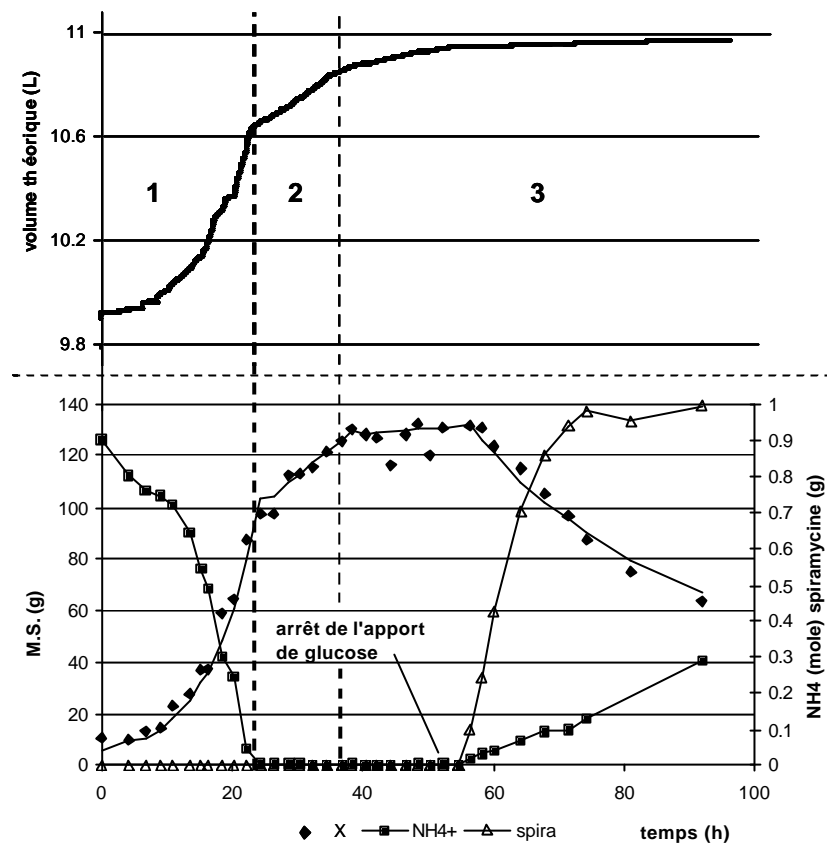
<sup>1</sup>, soit une valeur similaire à la culture de référence. Il apparaît que le titre en antibiotique n'est pas proportionnel à la valeur du flux limitant de glucose apporté pendant la phase stationnaire et que ce flux n'a pas d'effet inhibiteur sur la biosynthèse de la spiramycine.

#### IV.B.2.b.3. Culture Fed-batch n°3

Le résultat de la culture Fed-batch n°3 est présenté sur la figure IV.B.2.b.3.1. Les caractéristiques de la phase de croissance sont résumées dans le tableau IV.B.4.b.1.. En ayant observé que la production de spiramycine débute en phase stationnaire environ 28 heures après la carence en azote dans les précédentes cultures Fed-batch, l'alimentation en glucose a été coupée à 52 heures de fermentation.

Comme observé lors de la fermentation présentée au paragraphe IV.B.1., la carence en carbone exogène est immédiatement suivie d'une excrétion continue d'ions ammonium atteignant une concentration finale égale à 26 mM, et d'une décroissance très significative de la M.S. Le catabolisme des acides aminés semble bien correspondre à un besoin de carbone pour fournir l'énergie de maintenance.

La biosynthèse de spiramycine débute 30 heures après la carence en azote et se déroule en une phase, la concentration en ammonium en fin de culture ayant sans doute été inhibitrice par la suite. La production est caractérisée par une vitesse spécifique égale à  $0,57 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  et une concentration finale égale à  $90 \text{ mg.L}^{-1}$ ; ces valeurs sont donc similaires aux valeurs calculées pour la culture précédente et pour la culture de référence.



**Fig. IV.B.2.b3.1** Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la culture Fed-batch n°3  
(1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)

#### IV.B.2.c. Conclusion

Les cultures Fed-batch n°1, 2 et 3 montrent que la biosynthèse de la spiramycine n'est pas influencée par le flux limitant de glucose pendant la phase de production puisqu'elle est caractérisée par des vitesses spécifiques et des concentrations finales similaires quelque soit la valeur de ce dernier. Par ailleurs, le flux limitant de glucose n'a pas d'effet inhibiteur sur cette biosynthèse. Ce flux ne doit donc pas être intégré dans le modèle phénoménologique (cf. paragraphe III.E.2 du chapitre III) décrivant la production de spiramycine.

La biosynthèse de l'antibiotique serait donc influencée par la formation et l'utilisation des réserves intracellulaires formées après la carence nutritionnelle et la seconde hypothèse de simplification de la structure du modèle apparaît dès lors judicieuse. Parmi ces réserves, les lipides seraient de bons candidats pour le rôle clé conformément aux observations d'Olukoshi et Packter (1994) et à l'évolution du coefficient respiratoire pendant les phases linéaire et de production (cf. figure

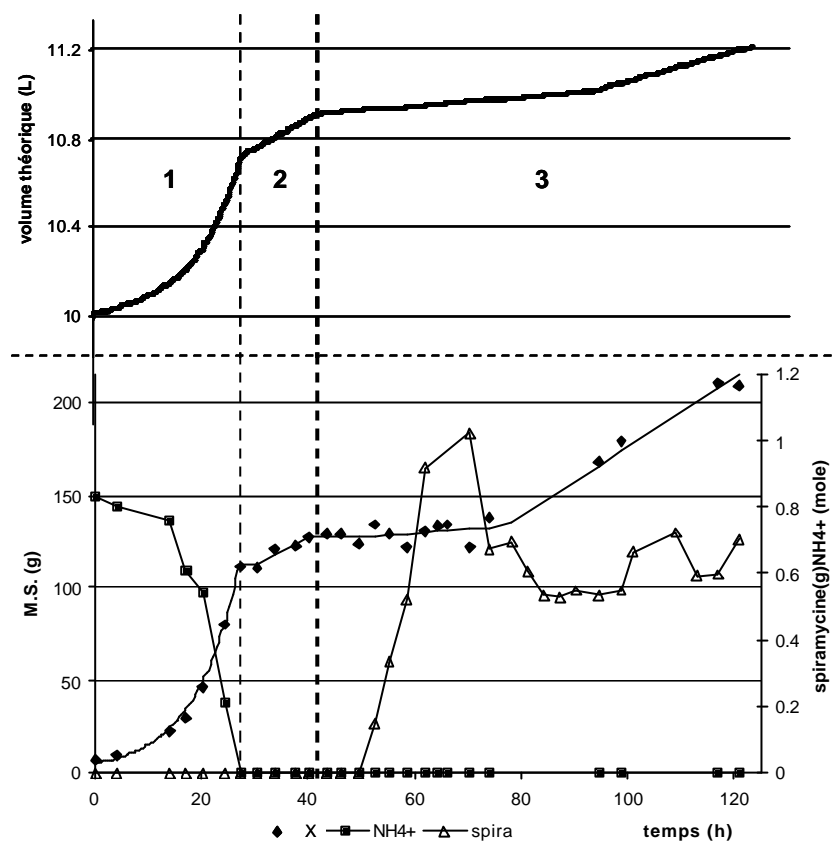
IV.B.2.b.1.2). Les lipides intracellulaires semblant jouer un rôle dans la biosynthèse de l'antibiotique, il a été décidé de remplacer le glucose par l'acide linoléique ( $C_{18:2}$ ) pendant la phase stationnaire afin d'observer si un ajout exogène d'une telle source de carbone a une influence sur la production de spiramycine. Cette fermentation est référencée "culture Fed-batch n°4".

#### IV.B.3. Etude de l'apport de lipides exogènes pendant la phase stationnaire

Le résultat de la culture Fed-batch n°4 est présenté sur la figure IV.B.3.1. Le substrat de la phase de croissance (phases 1 et 2) est le glucose tandis que celui de la phase stationnaire (phase 3) est l'acide linoléique. Les caractéristiques de la phase de croissance sont résumées dans le tableau IV.B.4.b.1.

La production de spiramycine débute 22 heures après la carence en azote ; vers 60 heures de fermentation, la culture a commencé à mousser fortement et le substrat à s'accumuler progressivement dans le milieu de culture. La spiramycine étant une molécule lipophile, une partie de l'antibiotique produit s'est accumulée dans l'huile résiduelle ce qui peut expliquer la cassure observée dans la cinétique de production après 60 heures de culture. En l'absence de méthode d'extraction avant le dosage HPLC, il n'a pas été possible de s'affranchir de la perte de spiramycine dans la phase huile. Jusqu'à 60 heures de fermentation, la production d'antibiotique est caractérisée par une vitesse spécifique égale à  $0,7 \text{ mg.g}_{\text{xn}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  soit une valeur environ 40% plus élevée que les valeurs mesurées pour les cultures Fed-batch n°1, 2 et 3..

L'apport d'une source de lipides exogènes après une phase de croissance sur glucose a donc un effet positif sur la biosynthèse de la spiramycine en terme de déclenchement de la production, plus précoce relativement à la carence nutritionnelle, et de potentiel de production (40% plus élevé). Afin de confirmer l'influence des réserves formées en phase linéaire, la culture Fed-batch suivante a été réalisée afin d'accumuler davantage de lipides intracellulaires, i.e. d'accumuler significativement plus de matière sèche dans le fermenteur, pendant la phase linéaire de croissance.

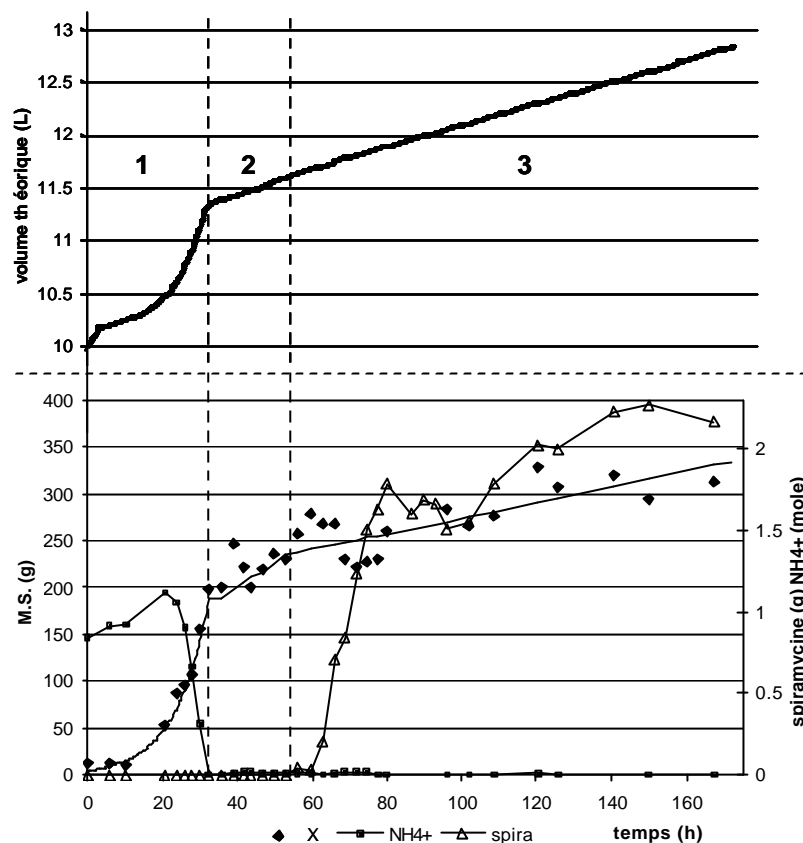


**Fig. IV.B.3.1** Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la culture Fed-batch n°4 (1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)

#### IV.B.4. Place des sources de carbone endogène dans le modèle

##### IV.B.4.a. Résultats

La conduite n°2 détaillée au paragraphe II.C du chapitre II a été mise en œuvre lors de la culture Fed-batch suivante. Le résultat est présenté sur la figure IV.B.4.a.1. Les caractéristiques de la phase de croissance sont résumées dans le tableau IV.B.4.b.1. La concentration en biomasse en fin de phase exponentielle a été multipliée par 1,8 par rapport à la culture Fed-batch de référence. L'augmentation de la concentration en M.S. dans le fermenteur pendant la phase linéaire a été 1,5 fois plus importante lors de cette fermentation par rapport à celle mesurée pour la culture Fed-batch de référence, à cause d'une sous-estimation du débit de glucose pendant cette phase (le but était de la doubler).



**Fig. IV.B.4.a.1 Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la culture Fed-batch n°5**

(1 : phase exponentielle ; 2 : phase linéaire ; 3 : phase stationnaire)

La production de spiramycine débute pendant la phase stationnaire à 60 heures de fermentation soit 28 heures après la carence en azote. Elle se déroule en deux phases comme observé lors de la culture Fed-batch de référence ; une phase de production rapide caractérisée par une vitesse spécifique égale à  $0,45 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  et une concentration finale égale à  $150 \text{ mg.L}^{-1}$ , soit une valeur 1,6 fois plus élevée que celle mesurée lors de la culture Fed-batch de référence, et une phase de production moins intense caractérisée par une vitesse spécifique égale à  $0,06 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

## IV.C. Conclusion

Cette étude expérimentale a eu pour objectifs :

- de valider le milieu de culture synthétique calculé pour reproduire une dynamique de croissance et de production similaire à celle observée sur milieu complexe

- d'achever le paramétrage du modèle i.e. déterminer une valeur numérique nominale pour le rapport de phosphorylation oxydative (les valeurs issues de la littérature lorsqu'elles sont utilisées pour ce modèle conduisent à des contradictions avec les connaissances biologiques, cf. paragraphe III.C.2, chapitre III)
- de déterminer quelle hypothèse de simplification de la structure du modèle (cf. paragraphe III.E.2., chapitre III) peut être utilisée, i.e. vérifier d'une part sa validité et d'autre part dans quelles conditions expérimentales elle peut être utilisée. Il est évident que ces conditions doivent permettre d'observer une production significative de spiramycine (objet de la modélisation).

L'expérimentation en mode Batch a permis d'écarter la première hypothèse avancée pour la simplification de la structure du modèle. Dans les conditions expérimentales mises en œuvre, il n'apparaît pas de corrélation cinétique entre la reconsommation de précurseurs exogènes (acétate et isobutyrate) et la production de spiramycine. La seconde hypothèse de simplification de la structure du modèle, supposant que la spiramycine est produite à partir des sources endogènes de carbone, a ensuite été étudiée en culture discontinue alimentée.

La première étape a été d'étudier la biosynthèse de spiramycine en l'absence de source de carbone dans le milieu de culture. Dans ces conditions, il apparaît que les protéines constituent la source de carbone et d'énergie privilégiée pour fournir l'énergie de maintenance. La "protéolyse" libère une quantité importante d'ions ammonium, inhibiteurs de cette biosynthèse. Il est de ce fait nécessaire de faire un apport de carbone exogène de façon adéquate pour ensuite décrire *in silico* cette production et de préciser l'influence du substrat sur la production de spiramycine de manière à intégrer son apport contrôlé de manière correcte dans le modèle.

Le mélange d'acides constituant la source de carbone exogène en culture Batch a été remplacé par un apport contrôlé de glucose représentant un flux de carbone identique. Dans ce cas, aucune accumulation d'ions ammonium n'est observée et la valeur du flux limitant de glucose n'a pas d'impact sur le potentiel et le niveau de production (titres similaires à la fin de la phase de production rapide que le flux pendant la production soit nul, à une valeur de référence ou 50% plus élevé que cette dernière). Il apparaît ensuite que ce titre en antibiotique est proportionnel à l'augmentation de la

concentration en M.S. pendant la phase linéaire de croissance i.e. à la formation des réserves intracellulaires suite au stress nutritionnel. Les substances de réserves, particulièrement les lipides, semblent être en première approximation le facteur déterminant le niveau de production de l'antibiotique en conditions non inhibitrices et non répressives (sucre et ammonium résiduels nuls).

La dynamique de production de spiramycine sera donc modélisée dans les conditions expérimentales de cette étude :

- Croissance limitée par l'azote
- Formation de réserves intracellulaires à partir d'un apport limitant contrôlé de glucose
- Absence d'accumulation de composés inhibiteurs (glucose, ammonium)

Il apparaît de ce fait nécessaire de décrire la dynamique d'accumulation des réserves intracellulaires, en particulier celles de nature lipidique, et de la relier de manière phénoménologique à la biosynthèse de la spiramycine.

**Tab. IV .B.4.b.1 Récapitulatif des caractéristiques phases de croissance des cultures Fed-batch sur glucose**

<b>Culture Fed-batch n°</b>	Taux de croissance en phase exponentielle  (h <sup>-1</sup> )	Rendement de formation de biomasse en phase exponentielle (g <sub>X</sub> ·g <sub>glucose</sub> <sup>-1</sup> )	Rendement global de formation de biomasse pendant la croissance (phase exponentielle + phase linéaire)  (g <sub>X</sub> ·g <sub>glucose</sub> <sup>-1</sup> )
<b>1</b>	0,11	0,51	0,46
<b>2</b>	0,15	0,48	0,47
<b>3</b>	0,13	0,47	0,46
<b>4</b>	0,12	0,57	0,47
<b>5</b>	0,11	0,46	0,43



**Tab. IV.B.4.b.2 Récapitulatif de valeurs caractéristiques des cultures Fed-batch sur glucose**

<b>Culture Fed-batch n°</b>	<b><math>\Delta t</math> entre la carence en azote et le début de la biosynthèse</b>	<b>[M.S.] en fin de phase exponentielle (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[M.S.] en fin de phase linéaire (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[spiramycine] à la fin de la 1<sup>ère</sup> phase de production (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vitesse spécifique moyenne de production de spiramycine (mg.g<sub>xn</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Apport limitant d glucose pendant l phase de production (g.h<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	28 h	9,4	11,9	92	0,52	2,8
<b>2</b>	27 h	9,4	11,8	105	0,5	4,4
<b>3</b>	30 h	9,2	11,8	90	0,57	0
<b>5</b>	28 h	17	20,8	150	0,45	5,8

## Chapitre V Structure et validation du modèle hybride à travers son utilisation comme capteur logiciel ou comme simulateur

### V.A. Structure du modèle

Comme indiqué au paragraphe III.E.2. du chapitre III, il est nécessaire que la structure du modèle développé dans cette étude soit hybride pour satisfaire à son domaine d'application. Cette structure relie de ce fait un modèle MFA pour décrire la biomasse et un modèle phénoménologique qui décrit la production de la spiramycine à partir, entre autre, des informations issues du modèle stoechiométrique. La validité du modèle ainsi construit est évaluée en l'utilisant pour :

- calculer en ligne des variables d'état du système (capteur logiciel)
- prédire la dynamique de croissance et de production d'antibiotique dans des conditions de culture variées (simulateur)

Les résultats de modélisation ne concerneront que la description de la phase de production rapide de spiramycine mise en évidence expérimentalement. La seconde phase de production moins intense observée lors de certaines fermentations est probablement liée à la lyse cellulaire et à un métabolisme de type cryptique (consommation des produits de la lyse), de ce fait elle ne peut pas être prise en compte par la modélisation stoechiométrique qui est la base du modèle construit.

#### V.A.1. Description de la biomasse

Compte tenu des spécificités des dynamiques de croissance et de production (phase exponentielle, phase linéaire puis phase stationnaire), il s'avère nécessaire d'utiliser deux modèles métaboliques pour décrire la structure de la biomasse au cours de la fermentation :

- Un modèle décrivant la croissance bactérienne durant la phase exponentielle de croissance en limitation de carbone
- Un modèle décrivant l'accumulation de la matière sèche après le stress nutritionnel sur l'azote

#### V.A.1.a. Description de la croissance de *S.ambofaciens* pendant la phase exponentielle

Le modèle métabolique utilisé est celui présenté au paragraphe III.B.2.b. du chapitre 3. Les paramètres symboliques du modèle sont remplacés par leurs valeurs nominales présentées au paragraphe III.C. du chapitre 3 et la valeur du paramètre  $\frac{P}{O}$  est fixée à 0,55 conformément au paramétrage du modèle présenté au paragraphe IV.A.2.d. du chapitre 4. Les vitesses nettes de consommation de substrat ( $r_s$ ) et d'oxygène ( $r_{O_2}$ ) exprimées en  $\text{mole.h}^{-1}$  sont utilisées pour calculer la distribution des flux métaboliques. Ce calcul permet d'avoir accès à la vitesse nette de croissance ( $r_x = \frac{dX}{dt}$ ) exprimée en  $\text{g.h}^{-1}$  compte tenu des coefficients stoechiométriques de sa voie de synthèse (cf. paragraphe III.A.1.k.). La biomasse est calculée par intégration en utilisant la méthode des trapèzes et en connaissant les conditions initiales (concentration en biomasse et volume du fermenteur).

#### V.A.1.b. Description de l'accumulation de matière sèche suite au stress nutritionnel sur l'azote

Il est communément admis que la division cellulaire s'arrête suite à une carence nutritionnelle et que l'augmentation consécutive de M.S. est due à l'accumulation de substances de réserves [Martin et Demain (1980)]. Dans le cas de cette étude, il est considéré que la croissance s'arrête ( $r_x = 0$ ) lorsque la source d'azote exogène est épuisée et que les macromolécules non azotées (glycogène, tréhalose, acides glycérol-téichoïques, phosphatidylinositol, diphosphatidylglycérol et triacylglycérols) sont produites par les cellules formées avant la carence et accumulées dans un compartiment (cf. figure V.A.1.b.1). Les vitesses de formation de ces macromolécules sont calculées en  $\text{g.h}^{-1}$  compte tenu des coefficients stoechiométriques utilisés dans leurs voies de synthèse, la masse formée de ces macromolécules est calculée par intégration et la M.S. totale est la somme de cette masse et de la biomasse formée à la carence en azote.

Pour calculer les flux métaboliques dans le cas où l'accumulation des polymères non azotés est prise en compte dans le réseau métabolique, il faut fixer quatre vitesses de réaction. Les vitesses nettes de consommation de substrat ( $r_s$ ), d'ammonium ( $r_{NH_3}$ ), d'oxygène ( $r_{O_2}$ ) et de production de  $CO_2$  ( $r_{CO_2}$ ) ont

été choisies. En utilisant leurs valeurs numériques en  $\text{mole.h}^{-1}$ , il est possible de décrire l'accumulation de la matière sèche consécutive à l'épuisement des ions ammoniums.

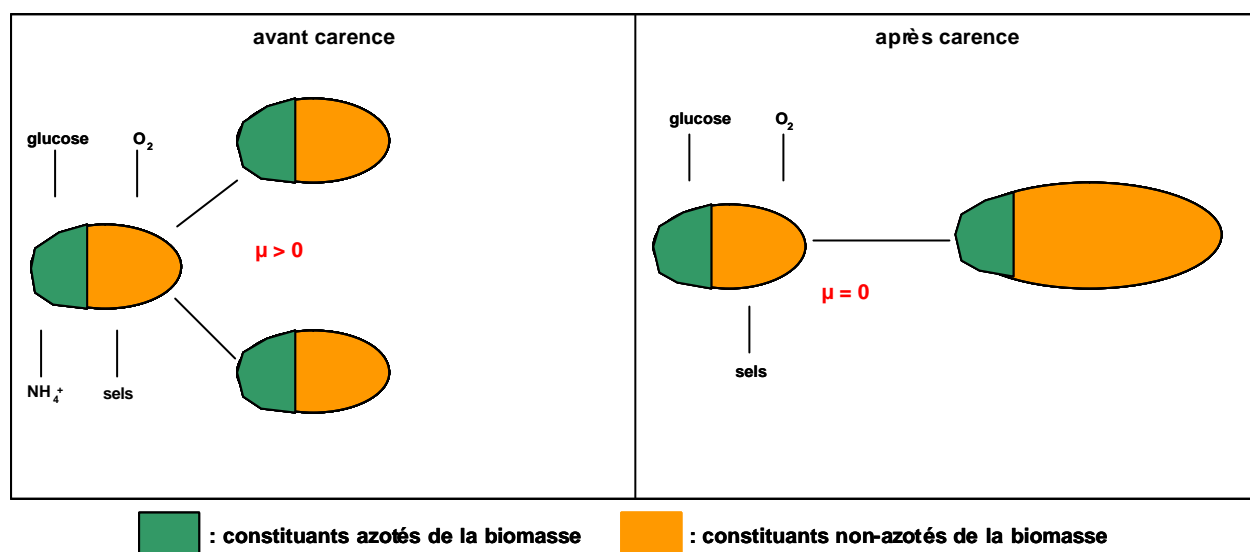


Fig. V.A.1.b.1 Structure de la biomasse avant et après carence en azote

## V.A.2. Production de spiramycine

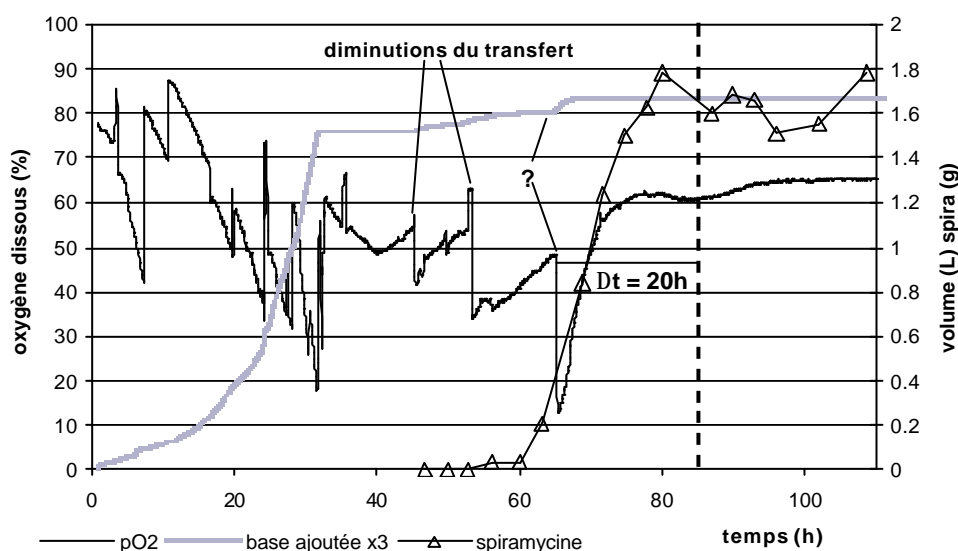
Afin de décrire la production de la spiramycine, un modèle phénoménologique très simple qui intègre trois paramètres a été utilisé. Ces trois paramètres sont les suivants :

- Le temps auquel la biosynthèse débute
- La vitesse spécifique de production
- Le temps auquel la biosynthèse s'arrête

Etant donné que cette biosynthèse a démarré à des temps similaires relativement à l'épuisement des ions ammonium pour les cultures alimentées en glucose (cf. chapitre IV, tableau IV.B.4.b.2), l'hypothèse formulée pour son démarrage est qu'il a lieu vingt huit heures après le ralentissement significatif de la croissance suite à un stress nutritionnel (dans le cadre de cette étude, carence ammonium). Les événements, incluant probablement des régulations au niveau génétique, qui se produisent lors de cette période ne sont pas connus et donc non décrits.

La vitesse nette de production de spiramycine est calculée à partir du potentiel de production. Il a été considéré en première approximation que la vitesse spécifique de production ramenée à la biomasse répliquative (i.e. formée à la carence en azote) est, pour les cultures carencées en azote et limitées en glucose, une constante égale à  $0,5 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (cf. chapitre IV, tableau IV.B.4.b.2). La vitesse nette de production est donc calculée en multipliant cette constante par la biomasse formée à la carence en azote. Cette biomasse est calculée en utilisant le modèle MFA.

Sur l'ensemble des cultures carencées en ammonium et limitées en glucose, il a été observé que la production de spiramycine s'arrête après un temps donné suivant un phénomène remarquable : une chute brutale et importante de la concentration en oxygène dissous concomitante d'un ajout de base pour réguler le pH (cf. exemple figure V.A.2.1). Ce phénomène est par ailleurs simultanément à un changement notable de morphologie de la culture : les pelotes formées pendant la phase de croissance sont quasiment intégralement fragmentées après ce phénomène. Après ce dernier, une observation au microscope permet de constater qu'il ne reste que des débris de filaments dans le milieu de culture. L'hypothèse formulée pour l'arrêt de la biosynthèse est qu'il a lieu vingt heures après l'observation de ce phénomène.

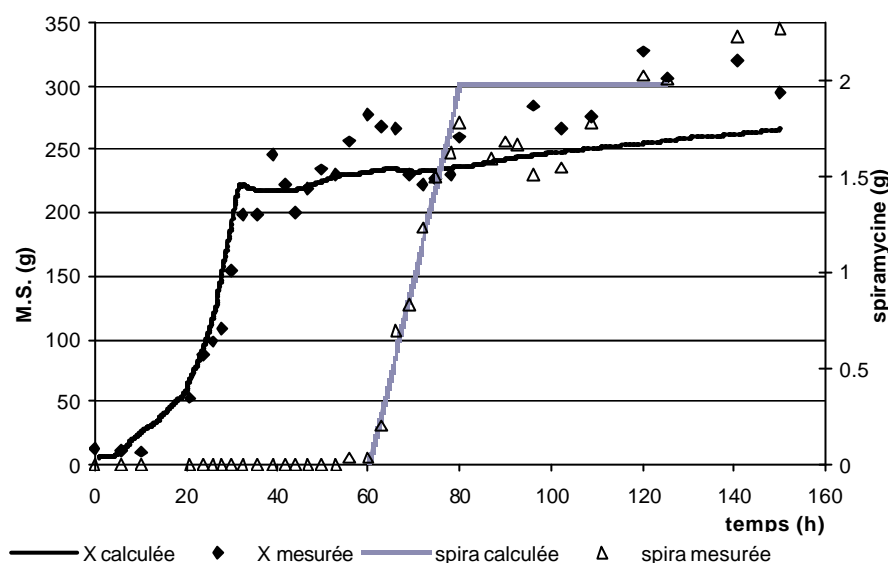


**Fig. V.A.2.1 Phénomène inexpliqué (?) précédant l'arrêt de la biosynthèse lors des cultures carencées en azote et limitées en glucose**

## V.B. Modélisation et simulation des cultures carencées en azote et limitées en glucose

### V.B.1. Utilisation du modèle construit en tant que capteur logiciel

Les résultats, biomasse formée et spiramycine produite, des cultures Fed-batch n°2 et 5 (cf. chapitre 4) ont été calculés en utilisant le capteur logiciel basé sur le modèle hybride décrit au paragraphe précédent et les mesures accessibles en ligne sur le fermenteur comme signaux d'entrée.



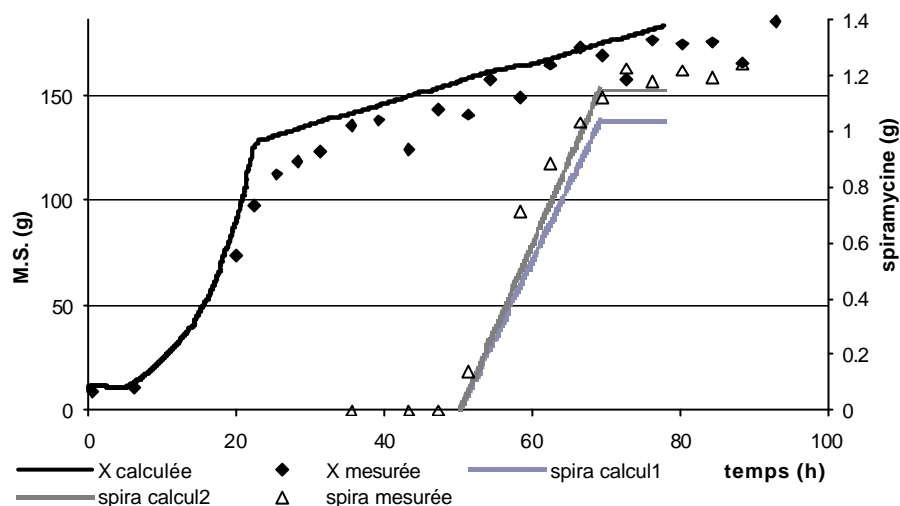
**Fig. V.B.1.1 Modélisation de la culture Fed-batch n°5**

La figure V.B.1.1 présente la réponse (traits continus) du capteur logiciel et les points expérimentaux (symboles).

En fin de croissance exponentielle, la M.S. estimée par le capteur logiciel est à 10,5% près la M.S. mesurée expérimentalement. Pour la suite de la culture, les écarts entre la réponse du capteur et les points expérimentaux sont compris entre 1 et 22%. Les écarts les plus importants peuvent être la conséquence de la dispersion des points expérimentaux après la carence en azote ; en effet, la mesure de M.S. par filtration est imprécise du fait de l'hétérogénéité du moût de fermentation, particulièrement importante pour un microorganisme filamenteux aux concentrations atteintes lors de cette culture (près de 20 g.L<sup>-1</sup>). Toutefois, la M.S. apparaît d'une manière générale sous estimée par le capteur après la fin de la phase exponentielle.

La spiramycine produite à la fin de la première phase de production (80 heures de culture) est estimée par le capteur logiciel avec une précision comprise entre 10 et 11%.

Les résultats de la fermentation n°2 ont été calculés de la même façon et sont présentés sur la figure V.B.1.2.



**Fig. V.B.1.2 Modélisation de la culture Fed-batch n°2**

Le calcul 1 a été réalisé de la même manière que pour la culture Fed-batch n°5 ; le calcul 2 a été réalisé en augmentant la valeur de la vitesse spécifique de production de 10%.

Il apparaît que la M.S. calculée par le capteur en fin de phase exponentielle présente un écart de plus de 20% avec le point mesuré. Dans le cas de cette culture, l'analyse des gaz de fermentation n'a pas été suffisamment précise pour que l'estimation de la vitesse de consommation d'oxygène soit correcte. De ce fait, le bilan redox sur la phase exponentielle de croissance présente un déficit de l'ordre de 20% et le biais sur la mesure de  $\dot{r}_{O_2}$ , utilisée pour calculer les flux métaboliques, peut expliquer l'erreur commise par le capteur logiciel.

La spiramycine estimée par le calcul 1 à la fin de la phase de production est à 12,7% près la valeur mesurée expérimentalement ; si le potentiel de production est augmenté de 10%, toute chose égale par ailleurs (calcul 2), la précision est inférieure à 3%.

Les performances du capteur logiciel sont donc dépendantes de la précision des mesures sur le bioréacteur instrumenté et de l'approximation faite sur le potentiel de production du microorganisme

considéré. De ce fait, le modèle hybride construit apparaît valable pour décrire l'évolution de la biomasse au cours de la culture (allure de la dynamique de croissance calculée conforme à la réalité) et la phénoménologie mise en œuvre pour décrire la biosynthèse de spiramycine limite la validité de la modélisation de cette production.

#### V.B.2. Utilisation du modèle construit en tant que simulateur

Afin d'évaluer la possibilité d'utiliser le modèle hybride servant de base au capteur logiciel comme un outil de simulation des productions de spiramycine, les résultats de la culture Fed-batch de référence (n°1) ont été simulés sans utiliser de données expérimentales.

Dans ce but, les mesures de vitesses ( $r_s$  et  $r_{O_2}$ ) ont été remplacées par des contraintes :

- Les contraintes résultant de la stratégie de conduite i.e. un apport limitant de glucose imposant l'évolution de la vitesse de consommation de substrat ( $r_s$ ) au cours du temps et une carence en ammonium impliquant  $r_{NH_3} = 0$
- Les contraintes résultant de la physiologie du microorganisme producteur au cours de la culture i.e. coefficient respiratoire (QR) égal à 1 pendant la phase exponentielle de croissance, à 1,15 pendant la phase linéaire de croissance, à 1 pendant la phase stationnaire excepté pendant la phase de biosynthèse où le QR est égal à 0,9

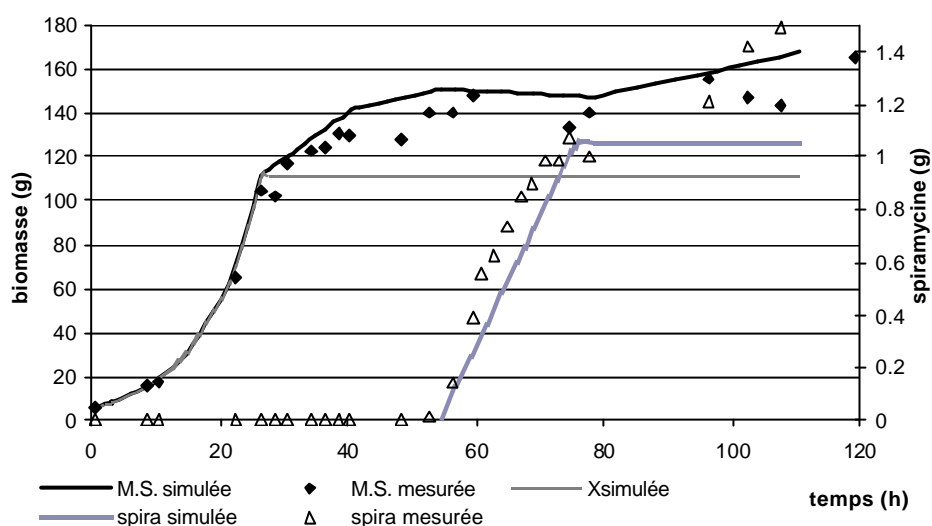
Le bioréacteur est modélisé par des équations différentielles ordinaires (ou ODE) décrivant les transferts de matière dans ce système. Le calcul est effectué par optimisation linéaire sous contraintes du réseau métabolique, de la stratégie de conduite et de la physiologie de la bactérie.

La production de spiramycine est décrite par le modèle phénoménologique présenté au 5.1.2. Les hypothèses sur le démarrage et la vitesse nette de production d'antibiotique sont les mêmes ; pour ce qui est de l'arrêt de la biosynthèse, déterminé par un délai consécutif à un phénomène inexplicable (chute de la concentration en oxygène dissous et ajout de base), l'hypothèse formulée est que ce phénomène est lié au vieillissement de la biomasse active provoqué par la carence en azote. Il est dès



lors considéré que la biosynthèse s'arrête un temps donné consécutif à l'épuisement des ions ammoniums.

Le résultat de la simulation de la culture Fed-batch de référence (n°1) est présenté sur la figure V.B.2.1 dans laquelle les valeurs simulées apparaissent en traits continus et les valeurs expérimentales en symboles.



**Fig. V.B.2.1 Simulation de la culture Fed-batch n°1 à l'aide du modèle hybride**

En ce qui concerne la biomasse, deux données sont distinguées :

- La biomasse réplivative ("Xsimulée") qui correspond à la biomasse formée à partir de la source d'azote présente initialement dans le milieu de culture
- La Matière Sèche qui est la somme de la biomasse réplivative et des réserves accumulées

Il en résulte que jusqu'à l'épuisement des ions ammoniums,  $X_{simulée} = M.S._{simulée}$ .

La biomasse formée à la carence en azote est simulée avec une précision de 6% par le modèle. Dans la suite de la culture, la M.S. est simulée avec une précision comprise entre moins de 1 et 15% ; les écarts les plus importants entre les valeurs simulées et les valeurs expérimentales peuvent également être attribués à la dispersion de ces dernières.

La spiramycine produite à la fin de la première phase de production est simulée avec une précision de l'ordre de 2%.

Il apparaît de ce fait que le modèle construit dans cette étude a le potentiel de simuler correctement le déroulement d'une fermentation au cours de laquelle il y a une production de spiramycine. Il est

nécessaire ensuite d'évaluer la robustesse de ce modèle i.e. sa capacité à simuler des conditions expérimentales significativement différentes.

## V.C. Validation de la robustesse du modèle hybride construit

### V.C.1. Définition de la culture de validation

Afin de valider la robustesse de ce modèle qui peut être utilisé en tant que simulateur, une culture a été définie et simulée de manière indépendante puis mise en œuvre expérimentalement. La comparaison des points expérimentaux obtenus *a posteriori* et des valeurs simulées *a priori* permet de vérifier si le modèle peut être utilisé pour faire de la prédiction d'expérimentations.

La culture dénommée "fermentation de validation" a été définie de manière à remplacer la phase linéaire de croissance en limitation carbone et carence azote (cf. figure V.C.1.1) des cultures Fed-batch présentées au chapitre 4 par une phase de limitation en carbone et azote.

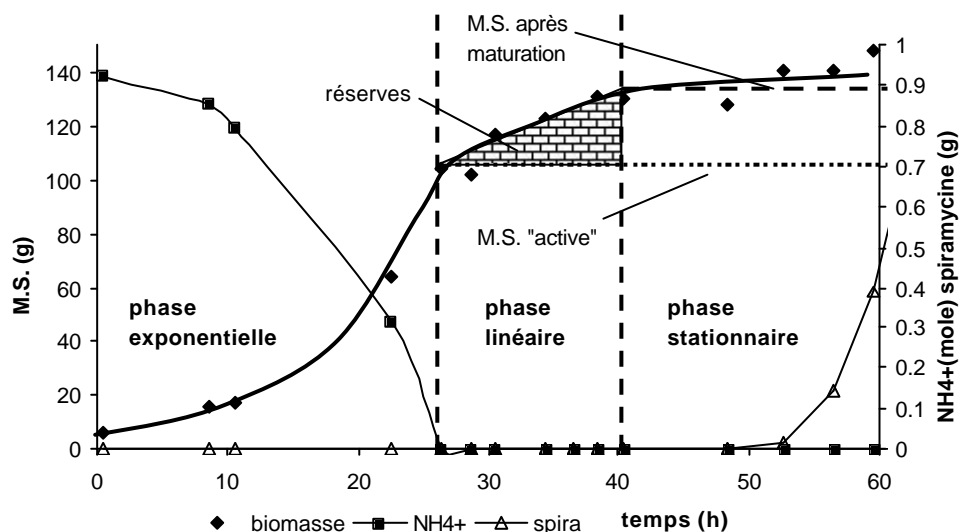


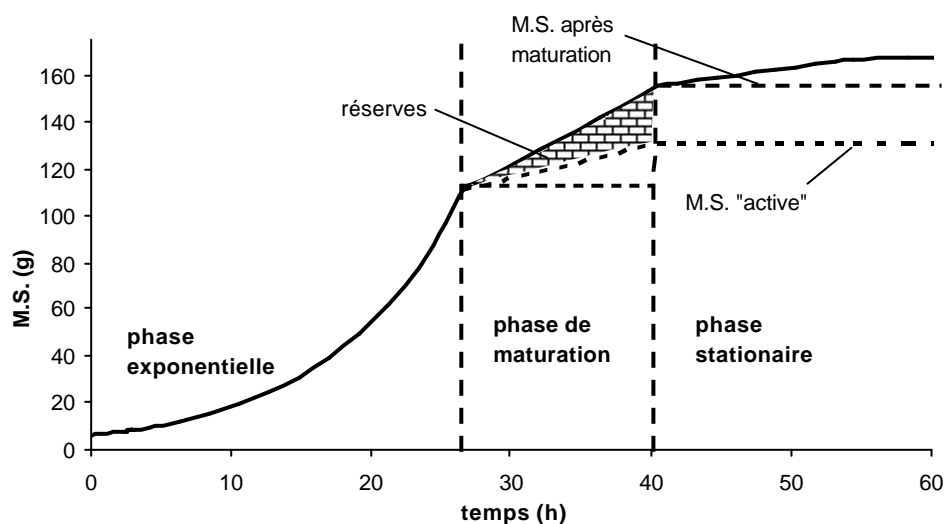
Fig. V.C.1.1 Détail de l'évolution de la biomasse lors d'une culture Fed-batch

Comme indiqué précédemment, il est considéré dans cette étude que l'accumulation de biomasse apte à la croissance s'arrête après la carence en azote et que l'accumulation de Matière Sèche consécutive est due à la formation de réserves. La phase linéaire de croissance est donc considérée comme un processus de maturation de la biomasse qui passe par une modification de sa composition macromoléculaire. La M.S. formée à l'épuisement de la source d'azote est considérée comme la partie catalytique de la biomasse, ou "M.S. active" tandis que la M.S. en fin de phase linéaire est considérée

comme la biomasse ayant acquis le potentiel de production d'antibiotique, ou "M.S. après maturation".

La conduite de la phase de maturation de la fermentation de validation a été définie de façon à imposer une croissance résiduelle très faible ( $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ , cf. évolution de la M.S. active sur la figure V.C.1.2) par un apport limitant d'ammonium. L'apport limitant de glucose pendant cette phase a été calculé de manière à ce que le rapport entre la M.S. après maturation et la M.S. active à la fin de cette phase soit égal au rapport mesuré lors des culture Fed-batch présentées au chapitre 4. De cette manière, la quantité de réserves formées durant cette phase doit être identique dans les deux cas (carence ou limitation en azote) et l'effet d'une croissance résiduelle assurée par une limitation en ammonium pourra être comparé à l'effet d'une carence en cette source d'azote. Enfin, la physiologie du microorganisme doit être modifiée lors de la phase de maturation par rapport aux précédentes cultures et la robustesse du modèle hybride vis-à-vis des conditions de culture peut être évaluée.

Les phases exponentielle et stationnaire de la fermentation de validation ont été définies de la même manière que les précédentes cultures Fed-batch (cf. conduite Fed-batch n°1, paragraphe II.C. du chapitre II).



**Fig. V.C.1.2 Détail de l'évolution de la biomasse visée lors de la fermentation de validation**

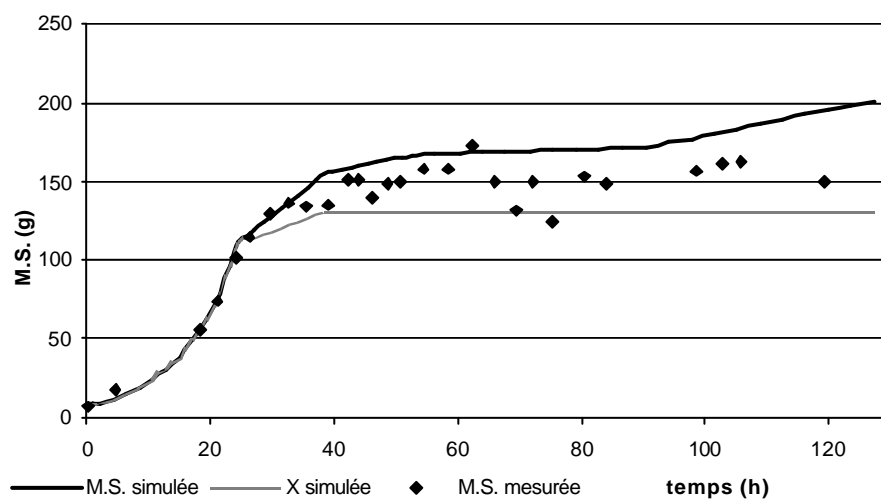
Les contraintes qui ont été imposées pour le calcul de simulation de la biomasse formée par le modèle hybride sont identiques à celles présentées au paragraphe V.B.2 ; elles intègrent en plus l'apport limitant d'ammonium.

Les hypothèses qui ont été formulées pour les paramètres du modèle phénoménologique sont les suivantes :

- La biosynthèse démarre 28 heures après la limitation de la croissance par l'azote
- La vitesse spécifique de production ramenée à la biomasse formée à partir de l'azote présent initialement et apporté pendant la phase de maturation est identique à celle utilisée pour modéliser les cultures en carence d'azote
- L'arrêt de la biosynthèse est provoqué par un vieillissement de la biomasse du à la carence en azote ; par conséquent la phase de production sera allongée de la durée de la phase de maturation (pendant laquelle il y a un apport limitant d'azote inorganique) par rapport aux précédentes cultures Fed-batch

## V.C.2. Résultats

La figure V.C.2.1 permet de comparer les prévisions du modèle (en traits continus) aux valeurs expérimentales mesurées (en symboles) pour la matière sèche formée. La courbe "X simulée" correspond à la biomasse active.



**Fig. V.C.2.1 Comparaison entre la biomasse simulée par le modèle et la biomasse mesurée expérimentalement lors de la fermentation de validation**

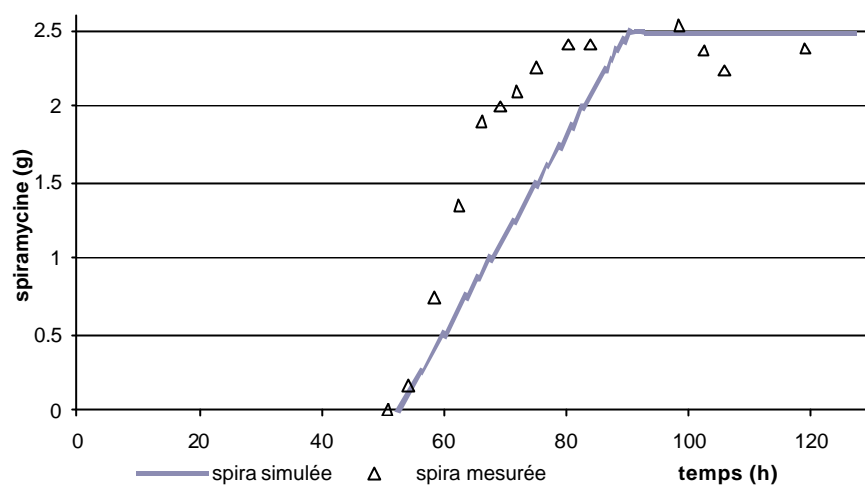
Il apparaît que la biomasse est simulée avec une bonne précision jusqu'en début de phase stationnaire (44 heures de culture) où l'écart entre le calcul et la mesure est proche de 5%. Pendant le reste de la phase stationnaire, le modèle a tendance à surestimer la M.S., les écarts entre les prédictions et les valeurs mesurées sont compris entre 2 et 36%. De la même manière que précédemment, les écarts les plus importants peuvent être attribués à la dispersion des points expérimentaux.

La figure V.C.2.2 permet de comparer les prévisions du modèle (en traits continus) aux valeurs expérimentales mesurées (en symboles) pour la production de spiramycine. Il apparaît que l'hypothèse sur le démarrage de la biosynthèse est vérifiée mais que la vitesse nette de production a été sous estimée tandis que la durée de la phase de production a été surestimée.

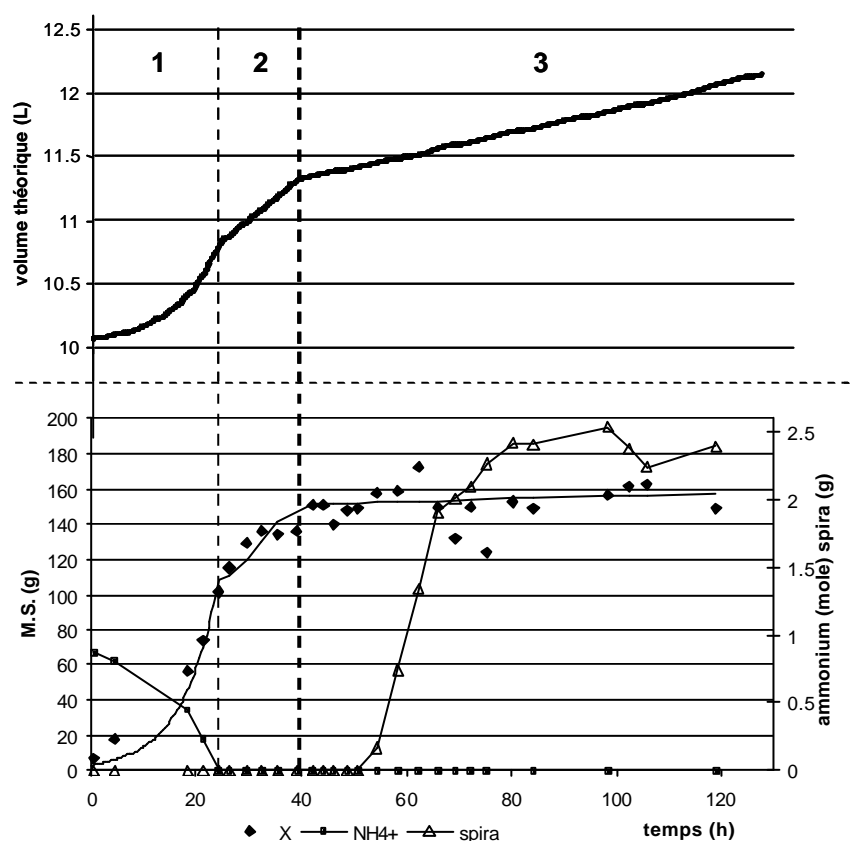
Le détail des résultats expérimentaux de cette fermentation est présenté sur la figure V.C.2.3. Il apparaît que la production de spiramycine démarre à 50 heures de fermentation soit 28 heures après le début de la limitation en azote et qu'elle ralentit vers 66 heures puis s'arrête à 80 heures. Une chute de la concentration en oxygène dissous concomitante d'un ajout de base s'est produite entre 63 et 64 heures de culture ; en revanche, l'observation de la morphologie de la culture a montré que les pelotes restent nombreuses après ce phénomène contrairement aux cas des cultures Fed-batch présentées au chapitre 4.

La vitesse spécifique moyenne de production de spiramycine est égale à  $0,75 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  soit une valeur 50% plus élevée que celles mesurées pour les cultures en carence d'azote. Le titre maximal en spiramycine mesuré est égal à  $215 \text{ mg.L}^{-1}$  ; la production spécifique de spiramycine ramenée à la biomasse active est égale à  $18,6 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}$  contre  $9,9 \text{ mg.g}_{\text{Xn}}^{-1}$  en moyenne pour une culture carencée en azote. Le gain d'un apport limitant d'ammonium pour ralentir la croissance et provoquer l'induction du métabolisme secondaire par rapport à une carence est de plus de 80% sur la production spécifique.

Ce saut au niveau du potentiel de production provoqué par un environnement nutritionnel manifestement plus propice lors de l'induction des voies de biosynthèse de la spiramycine n'avait pas été pris en compte dans le modèle phénoménologique de production. Ceci explique en partie la déviation observée sur la prévision du modèle ; l'autre phénomène non simulable en l'état actuel des connaissances est l'arrêt de la biosynthèse, toutefois il peut être prévu au cours de la fermentation avec le suivi en ligne de la concentration en oxygène dissous.



**Fig. V.C.2.2 Comparaison entre la production de spiramycine simulée par le modèle hybride et la production mesurée expérimentalement lors de la fermentation de validation**



**Fig. V.C.2.3 Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la fermentation de validation**  
(1 : phase exponentielle ; 2 : phase de maturation ; 3 : phase stationnaire)

## V.D. Conclusion

La modélisation métabolique hybride développée dans le cadre de cette étude a pu être validée de manière ambivalente.

D'une part, en utilisant des mesures expérimentales accessibles en ligne et traitées de manière adéquate, il est possible de construire un capteur logiciel pouvant calculer la Matière Sèche accumulée dans le fermenteur de même que de décrire en partie la structure macromoléculaire de la biomasse (le modèle est capable d'identifier et de quantifier la formation de substance de réserves suite à un stress nutritionnel). La précision du capteur est dépendante de la précision des mesures expérimentales ; étant donné que sa réponse est l'intégrale d'un calcul de vitesses, les erreurs sont cumulées au cours de la culture et la déviation de la réponse peut être significative même si son allure est conforme aux résultats expérimentaux. Ce problème est prévisible dès l'analyse de la sensibilité du modèle, cette dernière étant très importante vis-à-vis de la variation des vitesses fixées pour le calcul des flux. Le capteur permet également de calculer en ligne la quantité d'antibiotique produite dans les conditions de validité du modèle phénoménologique.

D'autres part, en remplaçant les mesures de vitesses par des contraintes physiques et biologiques, il est possible de construire un simulateur des cultures du microorganisme étudié. La prédiction est correcte pour la biomasse, cette dernière pouvant être simulée avec une bonne précision. Le modèle semble par ailleurs robuste vis-à-vis des conditions expérimentales. En revanche les causes de l'arrêt de la biosynthèse d'antibiotique ne sont pas connues et le potentiel de production n'est pas relié à la structure de la biomasse. Par conséquent, il n'est pas possible de simuler la quantité de spiramycine produite dans des conditions expérimentales sortant du cadre du paramétrage du modèle phénoménologique de production ; les limites de ce type de modélisation sont ici rejointes.

Il apparaît en revanche possible de construire un capteur de biomasse robuste en conservant la vitesse de consommation de substrat, qui est mesurée avec précision, comme mesure en ligne et en remplaçant la mesure de la vitesse de consommation d'oxygène par des contraintes sur le coefficient respiratoire (contraintes qui ont permis de construire un simulateur relativement robuste). Par ailleurs, comme il a été mis en évidence qu'il existe une corrélation entre le titre maximal en antibiotique et

l'accumulation des réserves après carence nutritionnelle, et que le capteur de biomasse est capable d'estimer cette accumulation, il serait potentiellement intéressant d'intégrer une fonction phénoménologique traduisant cette corrélation pour estimer de façon robuste la vitesse spécifique de production de spiramycine. La robustesse du capteur et du simulateur de production de spiramycine pourrait être améliorée de cette façon.



## CONCLUSION GENERALE

### **Conclusions**

Le but de ce travail de recherche était d'utiliser la modélisation comme approche pour décrire l'évolution de la biomasse en temps réel dans le cadre d'une production de métabolite secondaire, pour pouvoir éventuellement quantifier cette production et pour identifier des phénomènes-clés liés à la phase de biosynthèse.

La modélisation par analyse des flux métaboliques (MFA) présente l'avantage de ne s'appuyer que sur les connaissances stoechiométriques des voies métaboliques, d'être transposable à différents types de microorganismes et de permettre le calcul des flux de matière échangés non mesurés. En revanche, MFA est limité par l'incapacité à prendre en compte les processus de régulation métaboliques ou génétiques ayant lieu lors des transitions métaboliques. Appliqué à l'étude de différentes espèces de *Streptomyces* productrices d'antibiotiques, MFA a permis de montrer que les flux intracellulaires ne sont pas fondamentalement totalement perturbés lorsque la production d'antibiotique varie (intensification ou ralentissement). De ce fait, il semble que l'analyse des flux ne soit pas une méthode suffisamment sensible pour quantifier la biosynthèse d'antibiotique, produit secondaire minoritaire représentant typiquement moins de 1% du carbone consommé pendant la culture, et la mise en place de modèle hybrides couplant la stoechiométrie à la phénoménologie est une solution envisageable pour atteindre cet objectif.

Les données bibliographiques sur les voies métaboliques des *Streptomyces* en général, et de *S.ambofaciens* en particulier ont permis de construire un réseau métabolique modélisant le métabolisme central de la bactérie. Les données de structure et de composition pondérale macromoléculaire ont également permis de déterminer des valeurs numériques nominales pour les coefficients stoechiométriques symboliques intervenant dans les réactions anaboliques. Les données bibliographiques concernant la biochimie de la voie de synthèse de la spiramycine ont permis de compléter ce réseau et d'obtenir une description du métabolisme secondaire du microorganisme producteur. L'analyse du système d'équations de flux correspondant (sous forme symbolique) montre que son degré d'indétermination est égal à six et qu'il faut, pour sa résolution, évaluer un nombre de

vitesse supérieure au nombre de flux de métabolites échangés mesurables et linéairement indépendants. Par conséquent, la description de la distribution des flux dans les voies centrales et secondaires exige de disposer de l'estimation de trois vitesses intracellulaires non redondantes. Un choix possible consistait dans l'introduction d'une modélisation phénoménologique cinétique des réactions identifiées. Les étapes à caractériser pour lever l'indétermination de la résolution regroupent la voie des pentoses-phosphate, la voie anaplerotique et la dégradation de la valine ce qui peut laisser craindre un déterminisme trop important de la description de la croissance et des étapes de la biosynthèse de l'antibiotique, pouvant résulter en une modélisation indépendante de la biosynthèse. De ce fait, une simplification de la structure du réseau a été privilégiée afin de pouvoir l'exploiter à l'aide des mesures accessibles en ligne sur le bioréacteur instrumenté. Deux hypothèses de simplification, issues de la littérature, ont été envisagées. La première supposait l'existence d'une corrélation cinétique entre la production de spiramycine catalysée par la biomasse et la consommation de précurseurs exogènes (acides gras volatils). La seconde supposait que la spiramycine est issue du catabolisme des réserves de carbone endogène, principalement de nature lipidique. L'expérimentation s'est avérée dès lors nécessaire pour déterminer quelle hypothèse pouvait être vérifiée et, si tel était le cas, pour déterminer son domaine de validité.

L'étude expérimentale a nécessité la définition ainsi que la validation d'un milieu minéral reproduisant les conditions de croissance et de production qui peuvent être observées sur des milieux industriels complexes et qui peuvent être décrites par une phase de croissance exponentielle non carencée, l'obtention d'une carence en azote inorganique suivie d'une carence en glucose. De plus, un milieu minéral parfaitement défini permet de vérifier les bilans matière sur un nombre réduit de variables carbonées et d'atteindre le degré de reproductibilité exigé pour cette étude.

En culture batch, l'ajout de précurseurs exogènes (acétate et isobutyrate) au début de la phase de biosynthèse n'a pas eu d'incidence sur le potentiel de production ; la première hypothèse de simplification de la structure du modèle a donc été infirmée dans les conditions expérimentales mises en œuvre.

La seconde hypothèse de simplification a été étudiée en culture discontinue alimentée de manière à contrôler l'apport de carbone exogène. En l'absence de ce dernier, les protéines sont prioritairement consommées pour fournir le carbone et l'énergie nécessaire à la maintenance de la souche, ce qui a résulté dans l'excrétion d'ions ammonium à une concentration fortement inhibitrice de la production de spiramycine. Un apport limitant de glucose défini pour satisfaire les réactions de maintenance a permis de prévenir le relargage d'ammonium et d'obtenir une production relativement importante de spiramycine (100 mg.L<sup>-1</sup>) par rapport aux données disponibles pour des milieux glucose/ammonium. La valeur de ce flux de glucose n'a pas eu d'influence sur le potentiel et le titre final en antibiotique. Lorsqu'il a été stoppé en début de la phase de biosynthèse, le titre final s'est avéré identique confirmant le fait que la spiramycine peut être produite uniquement à partir des réserves de carbone endogène. Une corrélation entre la quantité de réserves formées après carence en azote et la quantité d'antibiotique produite a été mise en évidence par l'atteinte d'un titre de 150 mg.L<sup>-1</sup> avec une multiplication par 1,5 de la concentration en matière sèche formée en phase linéaire de croissance. L'analyse du coefficient respiratoire est compatible avec une accumulation de carbone dans des molécules fortement réduites (par exemple les lipides).

Ces expérimentations ont permis d'achever le paramétrage des coefficients stoechiométriques symboliques en déterminant une valeur acceptable pour le rendement énergétique  $\frac{P}{O}$  de la phosphorylation oxydative.

Le modèle a, de ce fait, été développé dans les conditions de mise en œuvre des cultures assurant les contraintes suivantes :

- Phase de croissance contrôlée par un apport limitant de glucose minimisant tout phénomène d'overflow carboné
- Phase de croissance carencée ou limitée par l'azote
- Phase de constitution de réserves intracellulaires à partir d'un apport limitant contrôlé de glucose
- Absence d'accumulation de composés inhibiteurs (glucose, ammonium)

La structure qui a été définie pour le modèle est hybride. Elle inclue un modèle métabolique de type MFA pour décrire la biomasse, identifier et représenter l'accumulation des réserves intracellulaires après limitation en azote. Ce modèle métabolique est couplé à un modèle phénoménologique décrivant la production de spiramycine à partir de la quantité de biomasse catalytique formée et des temps de début et de fin de production identifiés par des facteurs environnementaux : carence ammonium et évolution singulière de la concentration en oxygène dissous. La validité de la structuration de ce modèle hybride a été évaluée en l'utilisant en tant que capteur logiciel et comme simulateur.

Le capteur basé sur le modèle hybride a utilisé les mesures en ligne des vitesses de consommation de glucose et d'oxygène ainsi que l'évolution de la concentration en oxygène dissous pour calculer la biomasse formée et la quantité d'antibiotique produit. Sa précision pour la description de la croissance et de l'accumulation des réserves est apparue fortement dépendante de l'incertitude des mesures de vitesses et s'est située dans un intervalle de 1 à 25%. Toutefois l'allure de la dynamique de croissance s'est révélée conforme à celle déterminée expérimentalement.

En remplaçant les mesures de vitesses par des contraintes issues du pilotage de la culture et d'un paramètre caractéristique de la bascule métabolique vers la biosynthèse de réserves lipidiques (coefficient respiratoire), il a été possible de simuler de façon satisfaisante une culture avec croissance et production de spiramycine à l'aide de ce modèle hybride. Il a été également possible de prédire l'allure de l'évolution de la biomasse en double limitation de carbone et d'azote même si le simulateur a eu tendance à surestimer la matière sèche accumulée en phase stationnaire. En ce qui concerne la production de spiramycine, il s'est révélé apte à identifier l'initiation de la phase de biosynthèse avec une précision inférieure à l'heure pour une durée totale d'environ 80 heures. La fermentation en limitation carbone et azote, réalisée pour évaluer les prédictions du simulateur, a permis d'obtenir un titre en spiramycine de plus de 200 mg.L<sup>-1</sup>. Combinée à une formation de réserves en quantité deux fois plus importante, il apparaît envisageable d'atteindre des titres de l'ordre de 400 mg.L<sup>-1</sup> à partir de glucose et de sels, soit des valeurs de tout premier plan pour la souche Sp181110 utilisée dans cette étude.

L'intérêt direct du modèle hybride développé est son utilisation en tant que capteur logiciel. Cette étude a mis en relief qu'une adaptation réciproque du capteur et du procédé est nécessaire. L'objectif

n'a pas été de construire un capteur universel applicable dans toutes les conditions envisageables de croissance et de production, mais de co-développer un capteur et une conduite de culture microbienne pour une application donnée : le suivi en temps réel de la biosynthèse d'un métabolite secondaire. Pour des performances optimales du capteur, le procédé de production a donc dû être aménagé en augmentant le nombre de variables de contrôle sur ce dernier afin de fournir au capteur logiciel le nombre d'informations suffisant à sa mise en œuvre. Ainsi, en ouvrant le système, le mode de conduite de type fed-batch permet l'acquisition des informations critiques inaccessibles en cultures discontinues de type batch.

### **Perspectives**

La précision du capteur basé sur le modèle hybride construit reste à améliorer. En ce qui concerne la biomasse, le calcul de la matière sèche accumulée pourrait être amélioré en remplaçant la mesure de la vitesse de consommation d'oxygène, qui est la moins précise, par des contraintes sur le coefficient respiratoires qui se sont révélées adéquates pour la simulation des cultures. Pour ce qui est de la production de spiramycine, la précision du capteur pourrait être améliorée en introduisant une fonction phénoménologique qui pourrait évaluer le titre final en fonction de la quantité de réserves accumulées calculée par le capteur de biomasse.

Il serait intéressant d'évaluer la faisabilité de transposition de ce capteur à d'autres souches productrices de spiramycine, notamment des mutants améliorés pour cette caractéristique. La mutagenèse aléatoire demeure à l'heure actuelle un outil important pour améliorer les souches industrielles avec pour objectif le gain en productivité. Il est indispensable que le capteur puisse être adapté aux différents mutants pouvant être mis en œuvre à l'échelle industrielle pour conserver son intérêt. La transposition à des milieux de culture complexes doit également être envisagée pour déterminer si l'alimentation contrôlée en glucose et ammonium définie pour développer le modèle est capable de mimer la lente hydrolyse des sources industrielles complexes de carbone et d'azote. Enfin, la compréhension du ou des phénomènes biologiques régissant l'arrêt de la biosynthèse de spiramycine permettrait de décrire la cinétique complète de production de manière moins empirique et plus robuste.

Dès lors, son couplage à un système de supervision en tant que modèle pour l'isolation et la détection de fautes pourrait en faire un outil permettant de maîtriser les accidents de production et de conduire le procédé de biosynthèse d'antibiotique de manière optimale.

## Références bibliographiques

---

- ASSELINÉAU J., ZALTA J.P. *Les antibiotiques, structure et exemples de mode d'action*. Herman, Paris, 1973
- AVIGNONE ROSSA C., WHITE J., KUIPER A., POSTMA P.W., BIBB M., TEIXEIRA DE MATTOS M.J. Carbon flux distribution in antibiotic-producing chemostat cultures of *Streptomyces lividans*. *Metabolic Engineering*, 2002. **4**:138-150
- BATE N., BUTLER A.R., SMITH I.P., CUNDLIFFE E. The mycarose-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*, producer of tylosin. *Microbiology*, 2000. **146**:139-146
- BENTLEY S.D., CHATER K.F., CERDENO-TARRAGA A.M., CHALLIS G.L., THOMSON N.R., JAMES K.D., HARRIS D.E., QUAIL M.A., KIESER H., HARPER D., BATEMAN A., BROWN S., CHANDRA G., CHEN C.W., COLLINS M., CRONIN A., FRASER A., GOBLE A., HIDALGO J., HORNSBY T., HOWARTH S., HUANG C.H., KIESER T., LARKE L., MURPHY L., OLIVER K., O'NEIL S., RABBINOWITSCH E., RAJANDREAM M.A., RUTHERFORD K., RUTTER S., SEEGER K., SAUNDERS D., SHARP S., SQUARES R., SQUARES S., TAYLOR K., WARREN T., WIETZORREK A., WOODWARD J., BARRELL B.G., PARKHILL J., HOPWOOD D.A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002. **417**(6885):141-7
- BIDEAUX C. *Modélisation stoechiométrique des productions microbiennes par descripteur métabolique au moyen du calcul formel. Validation sur le modèle Kluyveromyces marxianus*. Thèse de doctorat, I.N.S.A. Toulouse, 2000
- BLONDELET-ROUAULT M.H., DOMINGUEZ H., DARBON-RONGERE E., GERBAUD C., GONDRAN A., KARRAY F., LACROIX P., OESTREICHER-MERMET-BOUVIER N., PERNODET J.L., TUPHILE K. Polypeptides involved in spiramycin biosynthesis, nucleotide sequences encoding said polypeptides and uses thereof. *Demande de brevet PCT* WO2004/033689 A2, 2004

- CAILLER F. *Traitement de mesures expérimentales par la méthode des bilans*. Diplôme d'Études Approfondies I.N.S.A. Toulouse, 1994
- CHRISTENSEN B., NIELSEN J. Metabolic Network Analysis of *Penicillium chrysogenum* using  $^{13}\text{C}$ -labelled glucose. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000. **68**:652-659
- CRAVERI R., MANACHINI P.L., ARAGOZZINI F., MERENDI C. Amino acid composition of the cell-proteins from mesophilic, thermofacultative and thermophilic Actinomycetes. *Journal of general microbiology*, 1973. **74**:201-204
- DAAE E.B., SON A.P. Classification and sensitivity analysis of a proposed primary metabolic reaction network for *S.lividans*. *Metabolic Engineering*, 1999. **1**:153-165
- DEMAIN A.L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnology Advance*, 2000. **18(6)**:499-514
- EDWARDS J.S., PALSSON B.O. How will bioinformatic influence metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998. **58**:162-169
- EGLI T., FIECHTER A. Short communication: theoretical analysis of media used in the growth of yeast on methanol. *Journal of General Microbiology*, 1981. **123**:365-369
- GOODFELLOW M., O'DONNELL A.G. Search and discovery of industrially-significant actinomycetes. In: *Microbial products: new approaches*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
- HEIJDEN R., HEIJNEN J., HELLINGA C., ROMEIN B., LUYBEN K. Linear constraint relations in biochemical reaction systems: calculability and the balanceability of conversion rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994a. **43**:3-10
- HEIJDEN R., ROMEIN B., HEIJNEN J., HELLINGA C., LUYBEN K. Linear constraint relations in biochemical reaction systems: diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994b. **43**:11-20
- HODGSON D.A. Differentiation in actinomycetes. In: *Prokaryotic Structure and Function*, Cambridge University Press, Cambridge, 1992.



- HODGSON D.A. Primary metabolism and its control in Streptomyces: a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 2000. **42**:47-238
- HONG BUM KIM, SMITH C.P., MICKELFIELD J., MAVITUNA F. Metabolic Flux Analysis for calcium dependant antibiotic (CDA) production in *Streptomyces coelicolor*. *Metabolic Engineering*, 2004. **6**:313-325
- HOPWOOD D.A. Forty years of genetic with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico* (review article). *Microbiology*, 1999. **145**:2183-2202
- IKEDA H., ISHIKAWA J., HANAMOTO A., SHINOSE M., KIKUCHI H., SHIBA T., SAKAKI Y., HATTORI M., OMURA S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 2003. **21(5)**:526-531
- JONSBU E., CHRISTENSEN B., NIELSEN J. Changes of *in vivo* fluxes through central metabolic pathways during the production of nystatin by *Streptomyces noursei* in batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001. **56**:93-100
- KANNAN L.V., REHACEK Z. Metabolism of *Streptomyces antibioticus*: variation of organic and amino acids. *Indian Journal of Biochemistry*, 1970. **7**:137-138
- KHAOUA S. *Régulation des étapes initiales de la biosynthèse de la spiramycine par Streptomyces ambofaciens*. Thèse de doctorat, I.N.P.L. Nancy, 1990
- KHAOUA S., LEBRIHI A., LAAKEL M., SCHNEIDER ., GERMAIN P., LEFEBVRE G. Influence of short-chain fatty acids on the production of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992. **36**:763-67
- KRUYSSSEN F.J., DEBOER W.R., WOUTERS T.M. Effects of carbon source and growth rate on cell wall composition of *B.subtilis* subsp. *niger*. *Journal of Bacteriology*, 1980. **144(1)**:238-246
- LASKIN A.I., LECHEVALIER H.A. *CRC Handbook of Microbiolog., volume II: microbial composition*. CRC Press, Cleveland (Ohio), 1973

- LEBRIHI A., LAMSAIF D., LEFEBVRE G., GERMAIN P. Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992. **37(3)**:382-87
- LOUNES A. *Régulation de la biosynthèse de la spiramycine chez Streptomyces ambofaciens par les sources azotes, carbonées et les ions phosphate*. Thèse de doctorat, I.N.P.L. Nancy, 1994
- LOUNES A., LEBRIHI A., BENSLIMANE C., LEFEBVRE G., GERMAIN P. Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Current Microbiology*, 1995. **31(5)**:304-11
- LOUNES A., LEBRIHI A., BENSLIMANE C., LEFEBVRE G., GERMAIN P. Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: effects of glucose and inorganic phosphate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996. **45(1-2)**:204-11
- MAC BRIDE M.J., ENSIGN J.C. Effects of intracellular trehalose content on *S.griseus* spores. *Journal of bacteriology*, 1987. **169**:4995-5001
- MADDEN T., WARD J.M., ISON A.P. Organic acid excretion by *Streptomyces lividans* TK24 during growth on defined carbon and nitrogen sources. *Microbiology*, 1996. **142**:3181-3185
- MARTIN J.F., DEMAINE A.L. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Review*, 1980. **44(2)**:230-251
- MAYFIELD C.I., WILLIAMS S.T., RUDDICK S..M., HATFIELD H.L. Studies of the ecology of Actinomycetes in soil. IV, Observation on the form and growth of Streptomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1972. **4**:79-89
- MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Annals of Chemistry*, 1959. **31**:426-429
- MONOD J. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann et Cie, Paris, 1958
- NAEIMPOOR F., MAVITUNA F. Metabolic Flux Analysis in *Streptomyces coelicolor* under various nutrient limitations. *Metabolic Engineering*, 2000. **2**:140-148
- NAEIMPOOR F., MAVITUNA F. Metabolic Flux Analysis in *Streptomyces coelicolor* :Effect of nitrogen source. *Focus Biotechnology*, 2001. **1**:131-145

- NAVARETTE R., VARA J., HUTCHINSON C. Purification of an inducible L-valine dehydrogenase of *S.coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*, 1990. **136**:273-281
- NIELSEN J. Metabolic engineering techniques for analysis of targets for genetic manipulations. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998. **58**:125-132
- NINET L., VERRIER J. *Production of spiramycin*. United States Patent (N°2,943,023), 1960
- NOORMAN H. *Methodology and modelling of microbial metabolism*. Thèse de doctorat, Technische Universiteit Delft, 1991.
- OLUKOSHI E.R., PACKTER N.M. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology*, 1994. **140**:931-943
- OMURA S. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acids synthesis. *Bacteriological Review*, 1976. **40**:681-697
- OMURA S., TAKESHIMA H., NAKAGAWA A., MIYAZAWA J., PIRIOU F., LUKACS G. Studies on the biosynthesis of 16-membered macrolide antibiotics using carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 1977. **16(13)**:2860-6
- OMURA S., KITAO C., HAMADA H., IKEDA H. Bioconversion and biosynthesis of 16-membered macrolide antibiotics. X. Final steps in the biosynthesis of spiramycin, using enzyme inhibitor: cerulenin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 1979. **27(1)**:176-82
- OMURA S., NAKAGAWA A. Biosynthesis of 16-membered macrolide antibiotics. *Antibiotics* Vol.IV. Springer-Verlag, 1981
- PEACOCK L., WARD J., RATLEDGE C., DICKINSON F.M., ISON A. How *Streptomyces lividans* uses oils and sugars as mixed substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003. **32**:157-166
- PINNERT-SINDICO S. Une nouvelle espèce de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques : *Streptomyces ambofaciens* n.sp. Caractères cultureux. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)*, 1954. **87**:702-707
- PONS M.N., DROUIN J.F., LOUVEL L., VANHOUTTE B., VIVIER H., GERMAIN P. Physiological investigations by image analysis. *Journal of Biotechnology*, 1998. **65(1)**:3-14

- REARDON K.F., SCHEPER T.H., BAILEY J.E. Metabolic pathway rates and culture fluorescence in batch fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Progress*, 1987. **3**:153-167
- ROELS J.A. *Energetic and kinetics in biotechnology*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 1983
- ROUBOS J.A., KRABBEN P., SETNES M., BABUSKA R., HEIJNEN J.J., VERBRUGGEN H.B. Hybrid model development for fed-batch bioprocesses; combining physical equations with the metabolic network and black-box kinetics. 6<sup>th</sup> U.K. workshop on fuzzy systems, neural fuzzy, fuzzy genetic and soft computing systems, 1999. Brunel University, Uxbridge.
- ROUBOS J.A., KRABBEN P., LUITEN R.G.M., BABUSKA R., HEIJNEN J.J. A semi-stoichiometric model for *Streptomyces* fed-batch cultivation with multiple feeds. 8<sup>th</sup> International conference on computer applications in biotechnology, modeling and control of biotechnological processes, 2001. Quebec, Canada.
- RUEDA B., MIGUELEZ E.M., HARDISSON C., MANZANAL M.B. Changes in glycogen and trehalose content of *Streptomyces brasiliensis* hyphae during growth in liquid cultures under sporulating and non-sporulating conditions. *FEMS microbiology letters*, 2001. **194**:181-185
- SAVINELL J.M., PALSSON B.O. Network analysis of intermediary metabolism using linear optimisation. *Journal of theoretical biology*, 1992. **154**:421-454
- SCHAUNER C., DARY A., LEBRIHI A., LEBLOND P., DECARIS B., GERMAIN P. Modulation of lipid metabolism and spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* unstable mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999. **65(6)**:2730-7
- SHAHAB N., FLETT F., OLIVER S.G., BUTLER P.R. Growth rate control of protein and nucleic acid content in *S.coelicolor* A3(2) and *E.coli* B/r. *Microbiololgy*, 1996. **142**:1927-1935
- SKOBILOVA N.K., ZAKHAROVA O.D., SUETIN S.O., NAUMOVA I.B., AGRE N.S. Cell wall composition of *S.roseoflavus* var. roseofungi and its *Nocardia*-like variant. *Mikrobiologiya*, 1983. **52(4)**:597-604
- STEPHANOPOULOS G.N., ARISTIDOU A.A., NIELSEN J. *Metabolic engineering, principles and methodology*. Academic Press, San Diego, London, 1998

STRESHINSKAIA G.M., NAUMOVA I.B., PANINA L.I. Chemical composition of the cell wall of *Streptomyces chrysomallus* which produces the antibiotic aurantin. *Mikrobiologiya*, 1979. **48(5)** :814-19

SUROWITZ K.G., PFISTER R.M. Glucose metabolism and pyruvate excretion by *Streptomyces alboniger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1985. **31**:702-706

TAKAC S., CALIK G., MAVITUNA F., DERVAKOS G. Metabolic flux distribution for the optimized production of L-glutamate. *Enzyme Microbial Technology*, 1998. **23**:286-300

TANG L., ZHANG Y.X., HUTCHINSON C.R. Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: valine is a source of precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. *Journal of Bacteriology*, 1994. **176(19)**:6107-19

THOMSON C.J., POWER E., RUEBSAMEN-WAIGMANN H., LABISCHINSKI H. Antibacterial research and development in the 21st Century-an industry perspective of the challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 2004. **7(5)**:445-50

UNTRAU S., LEBRIHI A., LEFEBVRE G., GERMAIN P. Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Current Microbiology*, 1994. **28**:111-118

VANROLLEGHEM P.A., HEIJNEN J.J. A structural approach for selection among candidate metabolic network models and estimation of unknown stoichiometric coefficients. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998. **58**:133-138

VARMA A., PALSSON B.O. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994. **60**:3724-3731

VU-TRONG K., GRAY P. Continuous culture studies on the regulation of tylosin biosynthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 1982. **24**:1093-1103

VU-TRONG K., GRAY P. Stimulation of enzymes involved in tylosin biosynthesis by cyclic feeding profiles in fed-batch cultures. *Biotechnology Letters*, 1986. **8**:849-852

WOODWARD R.B. Struktur und Biogenese der Makrolide : eine neue Klasse von Naturstoffen.

*Angewandte Chemie*, 1957. **69**:50-58

WEINBERG D. Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. *Folia*

*Microbiology*, 1978. **23**:496-504

WU K., CHUNG L., REVILL W.P., KATZ L., REEVES C.D. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene*, 2000. **251(1)**:81-90

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### ▪ FIGURES

Figure I.A.2.1 Domaines de validité des hypothèses simplificatrices	page 6
Figure I.B.1.1. Cycle de développement d'un <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	page 24
Figure I.C.1.b.1 évolution de la vitesse spécifique de production de tylosine en fonction du taux de croissance	page 32
Figure I.C.2.a.1 Formule semi-développée de la spiramycine	page 33
Figure I.C.2.a.2 Voie de biosynthèse de la spiramycine	page 35
Figure II.B.2.1 schéma du pilote de fermentation	page 45
Figure III.A.1.j.1 Structure de la biomasse	page 70
Figure III.A.1.j.2.1 Motif élémentaire de la muréine	page 72
Figure III.A.1.j.2.2 Ramification du peptidoglycane	page 72
Figure III.B.1.1 Fonctions proposées par le logiciel de construction du modèle métabolique	page 76
Figure III.C.2.1 Distribution des flux nominaux pour un rapport $\frac{P}{O}$ égal à 2	page 87
Figure III.C.2.2 Distribution des flux nominaux pour un rapport $\frac{P}{O}$ égal à 0,5	page 88
Figure III.E.2.1 Hypothèses de simplification du modèle métabolique étudiées dans le cadre de cette étude	page 94
Figure IV.A.1.b.1 Dynamique de croissance de <i>Streptomyces ambofaciens</i> et de production de spiramycine en culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude	page 96
Figure IV.A.1.b.2 Evolution des vitesses de respiration et du coefficient respiratoire en culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude	page 97
Figure IV.A.1.b.3 Evolution des concentrations en produits de fermentation en culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude	page 98
Figure IV.A.1.b.4 Evolution des vitesses spécifiques de production d'acides (qacétate, qisobutyrate) et de spiramycine (qspira) en culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude	page 100

Figure IV.A.2.b.1 Dynamique de croissance et de production de spiramycine en culture batch sur le milieu synthétique à l'échelle du vingt litres _____	page 105
Figure IV.A.2.b.2 Dynamique de production d'acides organiques et de spiramycine en culture batch sur le milieu synthétique à l'échelle du vingt litres _____	page 106
Figure IV.A.2.d.1 Borne inférieure du coefficient respiratoire pour satisfaire les contraintes biochimiques _____	page 108
Figure IV.A.3.b.1 Effet d'un pulse d'AGV sur la production de spiramycine en culture batch sur le milieu synthétique à l'échelle du vingt litres _____	page 110
Figure IV.A.3.b.2 Dynamique de production et de consommation des acides organiques et de spiramycine en culture batch sur le milieu synthétique à l'échelle du vingt litres _____	page 110
Figure IV.B.1.1 Dynamique de croissance et de production de spiramycine en culture Fed-batch sur le milieu synthétique à l'échelle du vingt litres _____	page 113
Figure IV.B.2.b.1.1 Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la culture Fed-batch n°1 _____	page 116
Figure IV.B.2.b.1.2 Evolution du coefficient respiratoire pour une culture Fed-batch _____	page 117
Figure IV.B.2.b.2.1 Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la culture Fed-batch n°2 _____	page 118
Figure IV.B.2.b.3.1 Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la culture Fed-batch n°3 _____	page 120
Figure IV.B.3.1 Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la culture Fed-batch n°4 _____	page 122
Figure IV.B.4.a.1 Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la culture Fed-batch n°5 _____	page 123
Figure V.A.1.b.1 Structure de la biomasse avant et après carence en azote _____	page 129
Figure V.A.2.1 Phénomène inexplicable (?) précédant l'arrêt de la biosynthèse lors des cultures carencées en azote et limitées en glucose _____	page 130
Figure V.B.1.1 Modélisation de la culture Fed-batch n°5 _____	page 131
Figure V.B.1.2 Modélisation de la culture Fed-batch n°2 _____	page 132



Figure V.B.2.1 Simulation de la culture Fed-batch n°1 à l'aide du modèle hybride	page 134
Figure V.C.1.1 Détail de l'évolution de la biomasse lors d'une culture Fed-batch	page 135
Figure V.C.1.2 Détail de l'évolution de la biomasse visée lors de la fermentation de validation	page 136
Figure V.C.2.1 Comparaison entre la biomasse simulée par le modèle et la biomasse mesurée expérimentalement lors de la fermentation de validation	page 137
Figure V.C.2.2 Comparaison entre la production de spiramycine simulée par le modèle hybride et la production mesurée expérimentalement lors de la fermentation de validation	page 139
Figure V.C.2.3 Dynamique de croissance et de production de spiramycine pour la fermentation de validation	page 139

## ▪ **TABLEAUX**

Tableau II.A.2.1 facteurs d'excès calculés pour le milieu de pré-culture (A) et le milieu de culture Batch (B)	page 43
Tableau III.C.1.a.1 Paramètres de composition macromoléculaire de <i>Streptomyces</i>	page 79
Tableau III.C.1.a.2 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques de la réaction de formation de la biomasse	page 80
Tableau III.C.1.b.1.1 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques des réactions de formation des acides nucléiques	page 81
Tableau III.C.1.b.2.1 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques de la réaction de formation des protéines	page 82
Tableau III.C.1.b.3.1 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques de la réaction de formation du pool de polysaccharides	page 83
Tableau III.C.1.b.4.1 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques de la réaction de formation du pool de lipides	page 83
Tableau III.C.1.b.4.2 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques de la réaction de formation du pool de phospholipides	page 84

Tableau III.C.1.b.4.3 Valeurs nominales des coefficients stoechiométriques des réactions de formation des PL et des TAG	page 85
Tableau III.D.2.1 Analyse de la sensibilité du modèle décrivant le métabolisme de <i>S.ambofaciens</i> en croissance limitée par le carbone sur milieu salin	page 90
Tableau IV.A.1.c.1 Bilan carbone pour la culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude	page 101
Tableau IV.A.1.c.2 Bilan carbone pour la phase de croissance non limitée de la culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude	page 101
Tableau IV.A.1.c.3 Bilan carbone pour la phase linéaire de la culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude	page 102
Tableau IV.A.1.c.4 Bilan carbone pour la phase de production rapide d'antibiotique de la culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude	page 102
Tableau IV.A.1.c.5 Bilan carbone pour la fin de la culture batch sur le milieu synthétique défini dans le cadre de cette étude	page 103
Tableau IV.A.3.b.1 Vitesses spécifiques de consommation d'AGV et de production de spiramycine en culture Batch sur le milieu synthétique	page 111
Tableau IV.B.4.b.1 Récapitulatif des caractéristiques phases de croissance des cultures Fed-batch sur glucose	page 125
Tableau IV.B.4.b.2 Récapitulatif de valeurs caractéristiques des cultures Fed-batch sur glucose	page 126

## Annexe n°1 : réactions de formation des macromolécules constitutives de la biomasse

### ■ Protéines :

$$\begin{aligned} & \text{coeffglut} * \text{glut} + \text{coeffglum} * \text{glum} + \text{coeffpro} * \text{pro} + \text{coeffarg} * \text{arg} + \text{coefflys} * \text{lys} + \text{coeffser} * \text{ser} \\ & + \text{coeffgly} * \text{gly} + \text{coeffcys} * \text{cys} + \text{coeffasp} * \text{asp} + \text{coeffasn} * \text{asn} + \text{coeffthr} * \text{thr} + \text{coeffmet} * \text{met} + \\ & \text{coeffileu} * \text{ileu} + \text{coeffala} * \text{ala} + \text{coeffval} * \text{val} + \text{coeffleu} * \text{leu} + \text{coeffphe} * \text{phe} + \text{coefftyr} * \text{tyr} + \\ & \text{coefftry} * \text{try} + \text{coeffhis} * \text{his} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \\ & * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \\ & * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \\ & * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + n + 2 * \text{nb}) * \text{atp} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \\ & * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \\ & * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \\ & * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + 3 * \text{nb}) * \text{gtp} + (4 * \text{coeffglut} + 4 * \text{coeffglum} + 4 * \text{coeffpro} + \\ & 4 * \text{coeffarg} + 4 * \text{coefflys} + 4 * \text{coeffser} + 4 * \text{coeffgly} + 4 * \text{coeffcys} + 4 * \text{coeffasp} + 4 * \text{coeffasn} + 4 * \\ & * \text{coeffthr} + 4 * \text{coeffmet} + 4 * \text{coeffileu} + 4 * \text{coeffala} + 4 * \text{coeffval} + 4 * \text{coeffleu} + 4 * \text{coeffphe} + 4 * \\ & * \text{coefftyr} + 4 * \text{coefftry} + 4 * \text{coeffhis} + n + 5 * \text{nb}) * \text{eau} \rightleftharpoons \text{protein} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} \\ & + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} \\ & + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} \\ & + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + n + 2 * \text{nb}) * \text{adp} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \\ & * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \\ & * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + \\ & 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + 3 * \text{nb}) * \text{gdp} + (4 * \text{coeffglut} \\ & + 4 * \text{coeffglum} + 4 * \text{coeffpro} + 4 * \text{coeffarg} + 4 * \text{coefflys} + 4 * \text{coeffser} + 4 * \text{coeffgly} + 4 * \text{coeffcys} \\ & + 4 * \text{coeffasp} + 4 * \text{coeffasn} + 4 * \text{coeffthr} + 4 * \text{coeffmet} + 4 * \text{coeffileu} + 4 * \text{coeffala} + 4 * \text{coeffval} + 4 * \\ & * \text{coeffleu} + 4 * \text{coeffphe} + 4 * \text{coefftyr} + 4 * \text{coefftry} + 4 * \text{coeffhis} + n + 5 * \text{nb}) * \text{p} + (4 * \text{coeffglut} + 4 * \\ & * \text{coeffglum} + 4 * \text{coeffpro} + 4 * \text{coeffarg} + 4 * \text{coefflys} + 4 * \text{coeffser} + 4 * \text{coeffgly} + 4 * \text{coeffcys} + 4 * \\ & * \text{coeffasp} + 4 * \text{coeffasn} + 4 * \text{coeffthr} + 4 * \text{coeffmet} + 4 * \text{coeffileu} + 4 * \text{coeffala} + 4 * \text{coeffval} + 4 * \\ & * \text{coeffleu} + 4 * \text{coeffphe} + 4 * \text{coefftyr} + 4 * \text{coefftry} + 4 * \text{coeffhis} + n + 5 * \text{nb}) * \text{h} \end{aligned}$$

### ■ ARN :

$$\text{coeffatp} * \text{atp} + \text{coeffgtp} * \text{gtp} + \text{coeffutp} * \text{utp} + \text{coeffctp} * \text{ctp} + (\text{coeffatp} + \text{coeffgtp} + \text{coeffutp} + \text{coeffctp}) * \text{eau} \rightleftharpoons \text{rna} + (2 * \text{coeffatp} + 2 * \text{coeffgtp} + 2 * \text{coeffutp} + 2 * \text{coeffctp}) * \text{p}$$

### ■ ADN :

$$\text{coeffdatp} * \text{datp} + \text{coeffdgt} * \text{dgt} + \text{coeffdctp} * \text{dctp} + \text{coeffdttp} * \text{dttp} + (\text{coeffdatp} + \text{coeffdgt} + \text{coeffdctp} + \text{coeffdttp}) * \text{eau} \rightleftharpoons \text{dna} + (2 * \text{coeffdatp} + 2 * \text{coeffdgt} + 2 * \text{coeffdctp} + 2 * \text{coeffdttp}) * \text{p}$$

### ■ Lipides :

$$(\text{coeffpalpa} / 2 + \text{coeffstepa} / 2) * \text{glyc} + (\text{coeffpalpa} * 3 / 2 + \text{coeffstepa} * 3 / 2) * \text{atp} + \text{coeffpalpa} * \text{palmitate} + \text{coeffstepa} * \text{stearate} \rightleftharpoons \text{phosphatidate} + (\text{coeffpalpa} * 3 / 2 + \text{coeffstepa} * 3 / 2) * \text{adp} + (\text{coeffpalpa} + \text{coeffstepa}) * \text{p} + (\text{coeffpalpa} + \text{coeffstepa}) * \text{h}$$

$$(\text{coeffpalpi} / 2 + \text{coeffstepi} / 2) * \text{glcp} + (\text{coeffpalpi} / 2 + \text{coeffstepi} / 2) * \text{glyc} + \text{coeffpalpi} * \text{palmitate} + \text{coeffstepi} * \text{stearate} + (\text{coeffpalpi} * 5 / 2 + \text{coeffstepi} * 5 / 2) * \text{atp} + (\text{coeffpalpi} + \text{coeffstepi}) * \text{eau} \rightleftharpoons \text{phosphatidylinositol} + (\text{coeffpalpi} * 5 / 2 + \text{coeffstepi} * 5 / 2) * \text{adp} + (\text{coeffpalpi} * 5 / 2 + \text{coeffstepi} * 5 / 2) * \text{p} + (\text{coeffpalpi} + \text{coeffstepi}) * \text{h}$$

$(\text{coeffpalps} / 2 + \text{coeffsteps} / 2) * \text{ser} + (\text{coeffpalps} / 2 + \text{coeffsteps} / 2) * \text{glyc} + \text{coeffpalps} * \text{palmitate} + \text{coeffsteps} * \text{stearate} + (\text{coeffpalps} * 5 / 2 + \text{coeffsteps} * 5 / 2) * \text{atp} + (\text{coeffpalps} / 2 + \text{coeffsteps} / 2) * \text{eau} \rightleftharpoons \text{phosphatidylserine} + (\text{coeffpalps} * 5 / 2 + \text{coeffsteps} * 5 / 2) * \text{adp} + (\text{coeffpalps} * 5 / 2 + \text{coeffsteps} * 5 / 2) * \text{p} + (\text{coeffpalps} + \text{coeffsteps}) * \text{h}$

$(\text{coeffpalpc} / 2 + \text{coeffstepc} / 2) * \text{ser} + (\text{coeffpalpc} / 2 + \text{coeffstepc} / 2) * \text{glyc} + \text{coeffpalpc} * \text{palmitate} + \text{coeffstepc} * \text{stearate} + (10 * \text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc} * 10) * \text{atp} + (5 * \text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc} * 5) * \text{eau} + (3 * \text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc} * 3) * \text{nadh} + (\text{coeffpalpc} * 3 / 2 + \text{coeffstepc} * 3 / 2) * \text{nadph} + (\text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc}) * \text{co} \rightleftharpoons \text{phosphatidylcholine} + (10 * \text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc} * 10) * \text{adp} + (\text{coeffpalpc} * 19 / 2 + \text{coeffstepc} * 19 / 2) * \text{p} + (3 * \text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc} * 3) * \text{nad} + (\text{coeffpalpc} * 3 / 2 + \text{coeffstepc} * 3 / 2) * \text{nadp} + (\text{coeffpalpc} * 7 / 2 + \text{coeffstepc} * 7 / 2) * \text{h}$

$(\text{coeffpaldpg} * 3 / 4 + \text{coeffstedpg} * 3 / 4) * \text{glyc} + \text{coeffpaldpg} * \text{palmitate} + \text{coeffstedpg} * \text{stearate} + (\text{coeffpaldpg} * 11 / 4 + \text{coeffstedpg} * 11 / 4) * \text{atp} + (\text{coeffpaldpg} * 3 / 4 + \text{coeffstedpg} * 3 / 4) * \text{eau} \rightleftharpoons \text{diphosphatidylglycerol} + (\text{coeffpaldpg} * 11 / 4 + \text{coeffstedpg} * 11 / 4) * \text{adp} + (\text{coeffpaldpg} * 9 / 4 + \text{coeffstedpg} * 9 / 4) * \text{p} + (\text{coeffpaldpg} * 5 / 4 + \text{coeffstedpg} * 5 / 4) * \text{h}$

$(\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{ser} + (\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{glyc} + \text{coeffpalpe} * \text{palmitate} + \text{coeffstepe} * \text{stearate} + (\text{coeffpalpe} * 5 / 2 + \text{coeffstepe} * 5 / 2) * \text{atp} + (\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{eau} \rightleftharpoons \text{phosphatidylethanolamine} + (\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{co} + (\text{coeffpalpe} * 5 / 2 + \text{coeffstepe} * 5 / 2) * \text{adp} + (\text{coeffpalpe} * 2 + \text{coeffstepe} * 2) * \text{p} + (\text{coeffpalpe} + \text{coeffstepe}) * \text{h}$

$\text{coeffpa} * \text{phosphatidate} + \text{coeffpe} * \text{phosphatidylethanolamine} + \text{coeffps} * \text{phosphatidylserine} + \text{coeffpi} * \text{phosphatidylinositol} + \text{coeffdpg} * \text{diphosphatidylglycerol} + \text{coeffpc} * \text{phosphatidylcholine} \rightleftharpoons \text{phospholipids}$

$(\text{coeffpaltag} / 3 + \text{coeffstetag} / 3) * \text{glyc} + \text{coeffpaltag} * \text{palmitate} + \text{coeffstetag} * \text{stearate} + (\text{coeffpaltag} + \text{coeffstetag}) * \text{atp} \rightleftharpoons \text{tag} + (\text{coeffpaltag} + \text{coeffstetag}) * \text{eau} + (\text{coeffpaltag} + \text{coeffstetag}) * \text{adp} + (\text{coeffpaltag} + \text{coeffstetag}) * \text{p}$

### Coefficients stœchiométriques utilisés :

coeffatp	mole d'ATP par gramme d'ARN
coeffctp	mole de CTP par gramme d'ARN
coeffdatp	mole de dATP par gramme d'ADN
coeffdctp	mole de dCTP par gramme d'ADN
coeffdgtp	mole de dGTP par gramme d'ADN
coeffdpg	gramme de diphosphatidylglycerol par gramme de phospholipides
coeffdttp	mole de dTTP par gramme d'ADN
coeffgtp	mole de GTP par gramme d'ARN
coeffpa	gramme de phosphatidate par gramme de phospholipides
coeffpaldpg	mole de palmitate par gramme de diphosphatidylglycerol
coeffpalpa	palmitate mole number per gram of phosphatidate

coeffpalpc	mole de palmitate par gramme de phosphatidylcholine
coeffpalpe	mole de palmitate par gramme de phosphatidylethanolamine
coeffpalpi	mole de palmitate par gramme de phosphatidylinositol
coeffpalps	mole de palmitate par gramme de phosphatidylserine
coeffpaltag	mole de palmitate par gramme de triacylglycerol
coeffpc	gramme de phosphatidylcholine par gramme de phospholipides
coeffpe	gramme de phosphatidylethanolamine par gramme de phospholipides
coeffpi	gramme de phosphatidylinositol par gramme de phospholipides
coeffps	gramme de phosphatidylserine par gramme de phospholipides
coeffstedpg	mole de stearate par gramme de diphosphatidylglycerol
coeffstepa	mole de stearate par gramme de phosphatidate
coeffstepc	mole de stearate par gramme de phosphatidylcholine
coeffstepe	mole de stearate par gramme de phosphatidylethanolamine
coeffstepi	mole de stearate par gramme de phosphatidylinositol
coeffsteps	mole de stearate par gramme de phosphatidylserine
coeffstetag	mole de stearate par gramme de triacylglycerol
coeffutp	mole d'UTP par gramme d'ARN
n	mole d'ATP par gramme de protéines
nb	mole d'ATP par gramme de protéines

## Annexe n°2 : résultat d'un calcul de vitesse du modèle stoechiométrique

$$r_{48} = \frac{95028120 \times (coeffdgt \times qtt dna + coeffgtp \times qtt rna) \times (R_4 - 6R_1)}{D}$$

### Symboles utilisés

$r_{48}$  : vitesse de la réaction  $ATP + GMP \rightleftharpoons ADP + GDP$

$R_1$  : vitesse de consommation de glucose

$R_4$  : vitesse de consommation d'oxygène

$D = 712710900 \times coeffutp \times qtt rna + 522654660 \times coeffarg \times qtt protein + 1092823380 \times coefftry \times qtt protein$   
 $+ 807739020 \times coeffmet \times qtt protein + 3334320 \times coefftre \times qtt polysacch +$   
 $3408372 \times coeffmurein \times qtt polysacch + 237570300 \times coeffser \times qtt protein +$   
 $665196840 \times coefflys \times qtt protein + 855253080 \times coeffdatp \times qtt dna + 712710900 \times coeffileu \times qtt protein +$   
 $2159730 \times coeffglycerolteichoic \times qtt polysacch + 380112480 \times coeffthr \times qtt protein +$   
 $3519560 \times coeffglycogen \times qtt polysacch + 285084360 \times coeffasp \times qtt protein +$   
 $427626540 \times coeffcys \times qtt protein + 522654660 \times coeffpro \times qtt protein + 427626540 \times coeffglut \times qtt protein$   
 $+ 760224960 \times coeffgtp \times qtt rna + 807739020 \times coeffdgt \times qtt dna + 570168720 \times coeffhis \times qtt protein +$   
 $427626540 \times coeffglum \times qtt protein + 807739020 \times coeffatp \times qtt rna + 712710900 \times coeffctp \times qtt rna +$   
 $2581597260 \times coeffstetag \times coefftag \times qtt lipids + 2296512900 \times coeffpaltag \times coefftag \times qtt lipids +$   
 $2720179935 \times coeffstedpg \times coeffdpg \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2435095575 \times coeffpaldpg \times coeffdpg \times coeffpl \times qtt lipids + 570168720 \times coeffva \times qtt protein +$   
 $285084360 \times coeffala \times qtt protein + 712710900 \times coeffleu \times qtt protein + 902767140 \times coefftyr \times qtt protein +$   
 $950281200 \times coeffphe \times qtt protein + 2470731120 \times coeffpalps \times coeffps \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2755815480 \times coeffsteps \times coeffps \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2518245180 \times coeffpalpg \times coeffpg \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2755815480 \times coeffstepe \times coeffpe \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2637030330 \times coeffpalpi \times coeffpi \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2803329540 \times coeffstepg \times coeffpg \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2351945970 \times coeffpalpa \times coeffpa \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2637030330 \times coeffstepa \times coeffpa \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2969628750 \times coeffstepc \times coeffpc \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2922114690 \times coeffstepi \times coeffpi \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2684544390 \times coeffpalpc \times coeffpc \times coeffpl \times qtt lipids +$   
 $2470731120 \times coeffpalpe \times coeffpe \times coeffpl \times qtt lipids + 997795260 \times coeffdtp \times qtt dna +$   
 $47514060 \times coeffgly \times qtt protein + 285084360 \times coeffasn \times qtt protein + 760224960 \times coeffdctp \times qtt dna$